



Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencias

**“ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN A ALTA PRESIÓN DE  
ACTIVOS DE PIEL DE LIMÓN Y SU POSIBLE USO EN LA  
IMPREGNACIÓN DE CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO EN LA OBTENCIÓN  
DE ENVASES ACTIVOS PARA SU USO ALIMENTARIO”**

**Autor:**

David Romero Tinoco

**Tutores:**

Dr. Casimiro Mantell Serrano

Dra. Lourdes Casas Cardoso

**TRABAJO FIN DE GRADO**

CURSO ACADÉMICO 2019/2020

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Puerto Real, Cádiz, Julio de 2020



## ***AGRADECIMIENTOS***

Aunque la situación en la que el presente trabajo se ha realizado no ha sido quizás la más motivadora de las posibles opciones, siempre se encuentra la luz al final del túnel.

Agradecer en primer lugar a Casimiro y Lourdes tanto por su labor de tutorización como por su capacidad para adaptarse a las circunstancias. La rapidez, perseverancia y disposición que han demostrado durante todo este tiempo lleno de incertidumbre, solo es digno de admirar y respetar.

Gracias a todos los amigos, familiares y compañeros de piso que han contribuido con su pequeño grano de arena a construir la montaña del éxito. Y como olvidar a aquellos amigos que han pasado a formar parte de la familia, Isabel e Irene, convirtiéndose en dos pilares fundamentales tanto de mi vida como de mi trayectoria académica inspirándome a ser mejor amigo y persona.

Agradecer profundamente a mis padres, los incansables, los verdaderos motores de mi vida y que me apoyan cada paso que doy por la confianza depositada y por la oportunidad para poder llegar hasta donde he llegado. Dar las gracias a mi hermano, que aunque lejos, siempre cerca, por querer siempre lo mejor para mí y apoyarme durante tanto tiempo.

Solo me queda decir GRACIAS a todos por estar a mi lado y por formar parte de este camino.



# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1 Generalidades de los cítricos.....	3
3.1.1 Características del limón .....	4
3.1.2 Aceite esencial.....	4
3.2 Extracción de compuestos bioactivos .....	6
3.2.1 Extracción con fluido supercrítico .....	7
3.2.2 Extracción mediante líquidos presurizados.....	8
3.3 Envases activos o inteligentes .....	9
3.4 Impregnación supercrítica .....	9
4. OBJETIVOS.....	11
5. SOLUCIÓN TÉCNICA .....	12
5.1 Materiales y métodos .....	12
5.1.1 Técnicas de extracción .....	14
5.1.1.1 Arrastre por vapor .....	14
5.1.1.2 Extracción con solventes orgánicos .....	16
5.1.1.3 Extracción con fluido supercrítico .....	17
i) Materia prima.....	18
ii) Metodología de extracción .....	19
iii) Rendimiento de extracción .....	20
5.1.1.4 Líquidos presurizados .....	20
5.1.2 Capacidad antimicrobiana de los extractos .....	21

5.1.3 Técnica de impregnación .....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA SOLUCIÓN TÉCNICA .....	26
6.1 Rendimiento extracción mediante arrastre con vapor .....	27
6.2 Rendimiento extracción con solventes orgánicos .....	28
6.3 Rendimiento experimental de la extracción supercrítica .....	31
6.4 Caracterización de flavonoides obtenidos mediante extracción por líquidos presurizados .....	33
6.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos .....	35
6.6 Estudio de impregnación con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	38
7. CONCLUSIONES .....	41
8. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	42
9. BIBLIOGRAFÍA.....	43

## 1. RESUMEN

Existe una gran cantidad de sustancias con propiedades antioxidantes y antimicrobianas que pueden resultar útiles para el ser humano presentes en el pericarpio de la cáscara de limón que constituyen los desechos y subproductos de la industria alimentaria. El aprovechamiento de estos residuos supone un aumento en las ganancias del sector y evita los problemas relacionados con la acumulación de los residuos.

Para comenzar, en este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se realiza una revisión bibliográfica sobre los métodos de extracción de las sustancias bioactivas a partir de la cáscara de distintos tipos de limones y a diferentes condiciones de operación entre las que se incluyen extracción mediante arrastre por vapor, con solventes orgánicos, con fluido supercrítico y mediante líquidos presurizados. Los resultados con mayor rendimiento se obtienen a partir de la extracción con metanol de la cáscara húmeda de limón real a 76 °C durante 4 horas. En el caso de la extracción con fluidos supercríticos, se hace un diseño de experimentos y se analiza experimentalmente la eficacia de este método.

A continuación, se discuten trabajos bibliográficos sobre la capacidad antimicrobiana de distintos extractos probados en la literatura sobre distintas bacterias tanto Gram + como Gram -. El aceite esencial de limón criollo fresco presenta una inhibición total sobre el crecimiento de la bacteria *B. glumae* cuando la concentración es de 4000 ppm.

Para concluir con el presente trabajo, se analizan los trabajos publicados centrados en el proceso de impregnación de las sustancias obtenidas de la piel de limón en diferentes polímeros para la construcción de envases activos con el objetivo de preservar las propiedades de los alimentos a conservar. El acetato de celulosa resultó ser el polímero que presenta un mayor rendimiento en la impregnación con timol cuando se realiza a 20 MPa durante un periodo de 16 horas.

## 2. ABSTRACT

There are a lot of substances with antioxidant and antimicrobial properties that can be useful to humans present in the pericarp of lemon peel that make up the wastes and by-products of the food industry. The use of this waste increases the benefits of the sector and avoids problems related to the accumulation of waste.

First, this Final Degree Paper (FDP) conducts a bibliographic review on the extraction methods of bioactive substances from the peel of different types of lemons and to different operating conditions including steam trawl extraction, organic solvents, supercritical fluid and pressurized liquids. The results with higher yield are obtained from the methanol extraction of the actual lemon moist peel at 76 °C for 4 hours. In the case of extraction with supercritical fluids, an experiment design is made and the effectiveness of this method is experimentally analyzed.

The antimicrobial capacity of different extracts tested in the literature on different Gram+ and Gram- bacteria is then evaluated. Fresh criollo lemon essential oil has a total inhibition on the growth of *B. glumae* when the concentration is 4000 ppm.

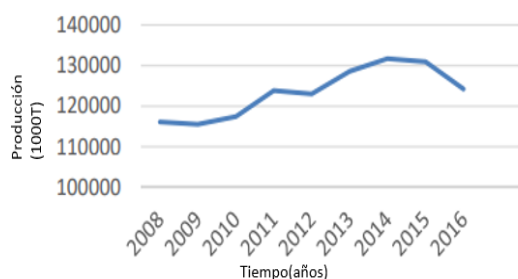
To conclude with this work, the process of impregnating the substances obtained from lemon peel in different polymers for the construction of active packaging is studied with the aim of preserving the properties of the food to be preserved. Cellulose acetate turned out to be the polymer with the highest yield in thymol impregnation when performed at 20 MPa over a period of 16 hours.



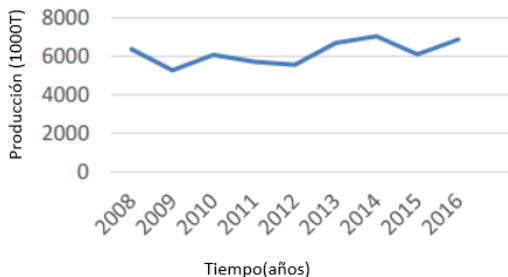
### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Generalidades de los cítricos

La producción de cítricos a nivel mundial ocupa gran parte de la producción agrícola, en España, esta producción la ha llevado a convertirse en el 4º productor mundial y 1º exportador mundial de cítricos. La cantidad de cítricos generados a nivel mundial comprende  $124 \cdot 10^6$  toneladas (Figura 1), siendo la producción en España de  $6,882 \cdot 10^6$  toneladas (Figura 2) (Conesa y Técnico, 2018).



**Figura 1.** Producción mundial de cítricos (FAO,2016).



**Figura 2.** Producción de cítricos en España (FAO,2016).

La previsión de cítricos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural para 2018/2019 era de un incremento del 2,5 % respecto de la anterior campaña, situándose en 2.212.016 toneladas, cantidad que además supone un 10,1 % más que la media de las últimas cuatro temporadas. El mayor volumen de producción en Andalucía corresponde a la naranja dulce con 1.605.514 toneladas, lo que representa casi el 73 % de los cítricos andaluces (Junta de Andalucía, 2018). El limón supone 115.942 toneladas correspondiendo con el 5 %. En el ámbito nacional se estima que la producción de limón suponga un 10 % de la producción de cítricos (Junta de Andalucía, 2018).

Aparejado a la creciente producción de cítricos en España, también se produce un incremento directamente proporcional de la cantidad de residuos de cítricos. Así, por ejemplo, se estima que los subproductos que se generan al utilizar cítricos para la obtención de zumos producen altas cantidades de residuos, entre las que destaca la cáscara, llegando a representar casi el 50% del peso del cítrico del que provienen (Betanzos, 2019). Por tanto, es de vital importancia el reciclaje y/o aprovechamiento de residuos alimentarios para obtener beneficios.

La mala gestión de los residuos supone un problema medioambiental, que origina un deterioro progresivo y acumulativo del entorno, lo que puede constituir en ciertos casos, un problema de higiene pública (Salazar de la Rosa, 2018). La quema indiscriminada de residuos provoca emisiones de gases tóxicos a la atmósfera y el abandono de los restos en el campo supone un riesgo para la propagación de plagas y enfermedades (Vargas y Vargas y col., 2019). El vertido de residuos provoca la contaminación de suelos, aguas superficiales y de los acuíferos por lixiviados de manera irreparable (Hernández-Cázares y col., 2016) además del abandono de

residuos metálicos que contienen los recursos naturales (Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, 2012).

Se hace necesario, por tanto, el tratamiento de los residuos con el fin de aportarles un nuevo camino hacia una correcta transición medioambiental. Los residuos de cítricos generados (pulpa, piel y semilla) tienen potencialidad como materia prima para la elaboración de productos comerciales como pectina, fibra y aceites esenciales. Existe una gran atención por parte de la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria sobre los aceites esenciales y la formulación de aromatizantes y saborizantes (Peñaranda y col., 2018). Otro posible uso de los residuos implica la producción de biogás que representan una fuente de energía renovable (Cendales, 2011). Sin embargo, la comunidad científica continúa estudiando otras potencialidades de aplicación de estos residuos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica por las excelentes propiedades que poseen.

### 3.1.1 Características del limón

Las frutas cítricas son comúnmente conocidas por su valor nutricional y pertenecen a la familia de las *Rutáceas*. Las especies más cultivadas del género *Citrus* son: las naranjas dulces *Citrus sinensis* L, naranjas agrias *Citrus aurantium* L., mandarinas *Citrus reticulata* Blanco, pomelos *Citrus paradisi* Macf, limas ácidas *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing., limones *Citrus limón* (L.), cidras *Citrus medica* L. y toronjas *Citrus máxima* (L.) (Klimek-szczykutowicz y col., 2020).

El limón es redondo, ligeramente alargado, posee una corteza fuerte y resistente, es de color amarillo intenso cuando está en plena madurez. El valor económico del fruto se debe a que se utiliza en fresco para usos culinarios y a nivel industrial se utiliza para la extracción de zumo y de aceites esenciales presentes en la pulpa. Sin embargo, la cáscara también sirve de alimento para el ganado y para la extracción de pectinas para la industria. También es muy utilizado en la industria farmacéutica por su elevado contenido en vitaminas: A, B, P, K y sobre todo C. No sólo tiene poder curativo a través de los medicamentos, sino también a nivel casero se puede utilizar como astringente, como tónico digestivo y en más remedios útiles (Frutas y Hortalizas, 2020). Por tanto, es importante continuar estudiando posibles aplicaciones que permitan revalorizar estos residuos. Para ello es necesario profundizar en la caracterización química y funcional de los extractos, así como en los métodos de extracción de estos.

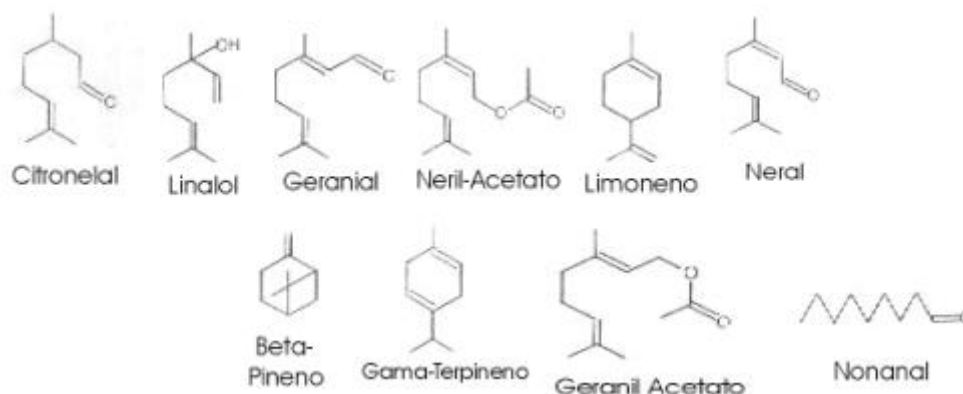
### 3.1.2 Aceite esencial

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (Cerutti y Neumayer, 2004). Los aceites esenciales son generalmente mezclas complejas de hasta más de 100 componentes como compuestos alifáticos de bajo peso

molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas y se les puede encontrar en diferentes partes de la planta como en hojas, raíces, pericarpio del fruto, semillas, tallo, flores y en los frutos.

Atendiendo a su consistencia, los aceites esenciales se pueden clasificar en esencias fluidas que se caracterizan por ser líquidos volátiles a temperatura ambiente, en bálsamos que presentan consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización y por último, se encuentran las oleorresinas que tienen el aroma de las plantas en forma muy concentrada y son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (Stashenko, 2009).

La cáscara del limón contiene 0,4 % de aceite, se encuentra en sacos de forma ovalada en el pericarpio o en la porción coloreada de la cáscara, y actúa como barrera tóxica natural contra microorganismos e insectos. El aceite de limón contiene aproximadamente 2% de sustancias no volátiles, alrededor de 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 3 cetonas, 4 ácidos y 23 hidrocarburos. Los componentes mayoritarios obtenidos de la cáscara del limón son: 63 % limoneno, 12 % beta-pineno, 9 % gamma-terpineno. Otros componentes cualitativamente importantes son el geranial, neral, neril acetato, geranil acetato, citronelal, linalol y nonanal (Figura 3). Los hidrocarburos de terpenos son insolubles en agua y susceptibles a oxidaciones y es necesario para producir un aceite estable y soluble, llevar a cabo operaciones de extracción, concentración y desterpenización (Cerutti y Neumayer, 2004 ; Koshima y col., 2012).



**Figura 3.** Compuestos característicos del aceite esencial de limón (Cerutti y Neumayer, 2004).

La aplicación en biomedicina de estos compuestos aparece descrita en la bibliografía. Como ejemplo indicar que se ha demostrado que el componente principal del aceite esencial de limón, el D-limoneno, presenta mediante su administración a una concentración del 0,5-1 % por inhalación en ratones un efecto calmante y ansiolítico ya que activa los receptores de serotonina y dopamina y presenta efecto inhibitorio en los receptores del dolor (Klimek-szczykutowicz y col., 2020).

### 3.2 Extracción de compuestos bioactivos

Los aceites esenciales y extractos de plantas se han utilizado desde hace mucho tiempo atrás para obtener aromas y sabores (Henning y col., 2016). Actualmente el estudio de extracción de estos compuestos se realiza desde un punto de vista funcional, sin embargo, esta funcionalidad está determinada por el método de extracción que se emplee. Las propiedades funcionales de los extractos varían con la proporción de los compuestos presentes y el método de extracción puede variar estas proporciones de forma significativa. Son muchos los estudios que han demostrado que la composición de los aceites esenciales puede variar de acuerdo con el método utilizado.

El método más común para extraer aceites esenciales es la destilación por arrastre con vapor de agua donde la muestra fresca y cortada en trozos pequeños, se introduce en una cámara cerrada inerte y se somete a una corriente de vapor de agua sobrecalentado. Esta técnica ofrece un alto rendimiento, una alta pureza de aceite y no requiere de tecnología sofisticada. Sin embargo, como principal desventaja se puede citar que pueden ocurrir procesos colaterales como polimerización y resinificación de los terpenos; así como hidrólisis de ésteres y destrucción térmica de algunos componentes (Navarrete y col., 2010).

Los aceites esenciales de cítricos obtenidos por prensado en frío tienen características odoríferas superiores a los obtenidos por cualquier método de destilación. Esto se debe a la ausencia de calor durante el procesado y a la presencia de componentes que no son volátiles en el vapor. Son también más estables a la oxidación, ya que contienen sustancias antioxidantes naturales, como tocoferoles, las cuales no son volátiles en el vapor. La ausencia de daño térmico en el aceite es significativa. Los aceites obtenidos por prensado en frío se extraen del pericarpio de la piel del cítrico, raspando o rompiendo los sacos de aceite cercanos a la superficie de la fruta. Este proceso involucra la abrasión de la piel (Cerutti y Neumayer, 2004).

Otro método empleado es la extracción con solventes orgánicos donde la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes como alcohol o cloroformo que solubilizan la esencia, pero extraen sustancias como grasas y ceras obteniéndose al final una mezcla impura. Algunos disolventes utilizados en este método de extracción tienen restricciones en cuanto a los restos que pueden permanecer en los aceites esenciales, especialmente cuando estos son la materia prima de industrias como la cosmética o la de alimentos. Estos límites varían de acuerdo con las diferentes legislaciones.

Los disolventes derivados del petróleo, como el éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos y al contacto con la piel y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. El método de enflorado permite obtener principalmente de las flores el aceite esencial poniéndolo en contacto con un aceite vegetal que actúa como disolvente de extracción. Se trata de una extracción sólido-líquido donde se obtiene

una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual se separa posteriormente por medios físico-químicos (Stashenko, 2009). Este método es utilizado solamente a muy pequeñas escalas.

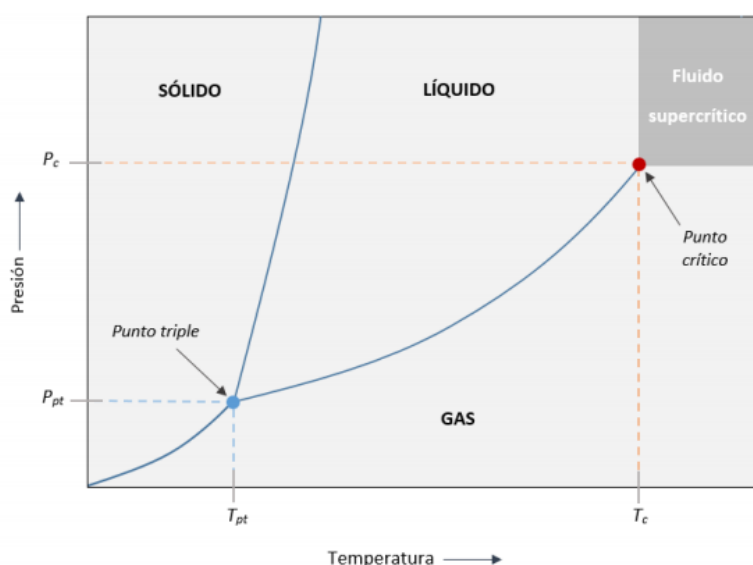
De manera general se puede concluir que los métodos convencionales de extracción requieren de posteriores etapas para purificar el extracto obtenido por lo que los costes energéticos aumentan. Además, en muchas ocasiones se utilizan disolventes orgánicos que no cumplen con el control, prevención y corrección del medio ambiente.

La aplicación de técnicas avanzadas como la extracción con disolventes a alta presión o supercríticos, permite, por las excelentes propiedades que adquieren en estas condiciones, realizar la extracción de sustancias de origen natural con rendimientos comparables o superiores a los obtenidos con técnicas convencionales. Además, permiten realizar extracciones más selectivas con el simple cambio de parámetros operacionales tales como presión y temperatura.

### 3.2.1 Extracción con fluido supercrítico

Un fluido supercrítico (FSC) es cualquier sustancia que se encuentre a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico (Hernández-Cázares y col., 2016). La Figura 4 muestra un fluido sometido a condiciones por encima de su punto crítico, encontrándose en su estado supercrítico y pasando a denominarse fluido supercrítico (Gil, 2016).

Los fluidos supercríticos, presentan una densidad similar a la del líquido y una viscosidad similar a la del gas (Esquivel F. y Vargas Aguilar, 2007; Morère, 2017). Al presentar propiedades intermedias entre el líquido y el gas (Rivera y col., 2016), lo hace idóneo para procesos de extracción ya que es capaz de penetrar en la matriz como si fuese un gas y presenta el mismo poder de extracción que el líquido (Gil, 2016).



**Figura 4.** Diagrama de fases de una sustancia pura (Gil., 2016).

La extracción con fluidos supercríticos se trata de una operación unitaria de transferencia de masa que se efectúa por encima del punto crítico del solvente permitiendo controlar y manipular propiedades como difusividad, viscosidad y densidad del fluido mediante cambios en la presión y temperatura conduciendo a una variación en la selectividad y el poder solvente de este (Esquivel F. y Vargas Aguilar, 2007). Se trata de una técnica no convencional de extracción y resulta prometedor por sus numerosas ventajas tales como que es ecológicamente compatible, se elimina fácilmente por despresurización y se puede reutilizar; las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes del aceite a obtener; la selectividad del proceso se puede ajustar por cambios de presión y temperatura; y la polaridad del fluido puede ser modificada al añadir pequeños porcentajes de codisolventes. El disolvente más utilizado es el CO<sub>2</sub> cuyas propiedades críticas son bajas (7,38 MPa, 31,06 °C) además, es inerte químicamente, no tóxico, no inflamable y barato.

Por contraparte, presenta efectos negativos puesto que se trata de un equipo costoso debido a que las bombas y sistemas requeridos para desarrollar el proceso deben ser resistentes a altas presiones lo que implica que los materiales a usar deben ser de máxima calidad y cumplir con las exigencias del proceso (Benjamin y col., 2019).

El estudio realizado por Quevedo (2011) lleva a cabo la extracción con CO<sub>2</sub> puro del aceite esencial de la cáscara fresca de limón previamente troceada. Se determinaron unas condiciones óptimas de temperatura de 45 °C y una presión de 200 bar. En estudios como el de Romero y col. (2004) se experimenta el uso del CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas para extraer el aceite esencial de la albahaca. Para ello, se realiza un diseño experimental factorial estableciendo que los factores que influyen en el rendimiento del aceite es el número de ciclos, flujo de CO<sub>2</sub> y el corte de la hoja.

### 3.2.2 Extracción mediante líquidos presurizados

La extracción mediante líquidos presurizados, siendo el disolvente más común el agua, se trata de una técnica de extracción verde en la que no se emplean disolventes perjudiciales o nocivos para la salud humana o el medio ambiente (Cvjetko y col., 2018). Implica el uso de disolventes a altas temperaturas y presiones sin llegar a su punto crítico de forma que los disolventes en todo el proceso de extracción se encuentran en estado líquido (Sanchez, 2017).

El estudio realizado por Khuwijitjaru y col. (2008) afirma que el uso de agua presurizada a alta temperatura está adquiriendo gran interés debido a que es respetuoso con el medio ambiente en la extracción de gran cantidad de sustancias de diferentes materiales. Como problema, en este método se alcanzan altas temperaturas (100-250 °C) que pueden provocar la degradación de los componentes termolábiles así como la baja selectividad de los disolventes (Plaza y Marina, 2019). Estudios como el de Kim y Lim (2020) utilizan la extracción en semicontinuo con agua en estado subcrítico para extraer los flavonoides de la piel de *Citrus unshiu*. Otro estudio realizado por Ko

y col. (2011) realizan la extracción del flavonoide quercetina con agua subcrítica de la piel de cebolla.

### 3.3 Envases activos o inteligentes

El aumento en el consumo de alimentos elaborados y frescos de gran valor se ha elevado en los últimos años. Esto ha motivado el estudio de nuevos sistemas de envasados que sustituyan al envasado tradicional que asegura únicamente una barrera pasiva frente al medio exterior (Rivas, 2012). Estos envases contribuyen de forma activa a la conservación del alimento permitiendo prolongar la vida útil, reducir pérdidas físicas, organolépticas y nutricionales asegurando así la calidad e inocuidad de los productos finales. Este tipo de envases, denominados envases activos se definen como aquel envase que interacciona con el alimento o su atmósfera alargando tanto el tiempo como las características sensoriales y de seguridad del alimento en el tiempo.

Los sistemas de envasados activos presentan tres formas básicas de actuación: el componente activo se encuentra en el interior del envase o formando parte de él, en sobres, bolsitas o etiquetas que contienen la sustancia activa o mediante películas sintéticas y comestibles que integran en su estructura el principio activo (Oliver y col.,2010).

Existe gran variedad en los tipos de envases activos dentro de los cuales se encuentran: los **Tipo I** que incorporan absorbentes de oxígeno, absorbentes de etileno, absorbentes de humedad, absorbentes de sabor/olor; los **Tipo II** que son sistemas de liberación como emisores de etanol, liberación de antimicrobianos y de antioxidantes o estabilizadores químicos (Oliver y col., 2010); los sistemas **Tipo III** que son sistemas con efecto térmico de forma que regulan la temperatura del producto envasado (Rivas, 2012); y por último, ssistemas **Tipo IV**, que son sistemas reguladores como films permeables o atmósfeas modificadas (Cejudo, 2019). Los envases activos de tipo II son los que están experimentando un mayor desarrollo. Como los extractos de cítricos y en particular los de cáscara de limón tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, sería razonable considerar el uso de estos extractos en la impregnación de plásticos para la preservación de alimentos ya que el motivo principal de la pérdida de propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos se asocian a la degradación microbiana y a la oxidación (Cejudo, 2019).

### 3.4 Impregnación supercrítica

Una alternativa que está cobrando importancia en la impregnación de diferentes polímeros con aplicaciones farmacéuticas y alimentarias es la impregnación con CO<sub>2</sub> supercrítico. El proceso de impregnación con fluidos supercríticos se basa en la partición del soluto de interés, en función de su afinidad, entre la fase supercrítica y la matriz solida a impregnar (Gómez, 2019).

En una primera etapa este fluido supercrítico disuelve la sustancia utilizada para la impregnación del material y junto con este penetra con facilidad en el material poroso a impregnar facilitando el deslizamiento de unas cadenas poliméricas sobre otra lo que genera un aumento en el volumen libre y la permeabilidad facilitando la difusión de la sustancia (Luna, 2014). La sustancia para impregnar queda depositada en el material gracias a la precipitación dentro de los poros (Montes y col., 2018) y el CO<sub>2</sub> sale del sistema tras la despresurización obteniendo como resultado el material poroso impregnado y seco que queda listo para su uso final (Micó y col., 2011).

Es importante en este proceso tener en cuenta los posibles cambios físicos y estructurales que se hayan podido producir en la matriz polimérica que se ha impregnado (Weidner, 2018), ya que debe mantener las cualidades óptimas en cuanto a las características mecánicas y de funcionamiento que requiere un material para envasado de alimentos (Luna, 2014).

Estudios como el de Luna (2014) demuestran la eficacia del método de impregnación con CO<sub>2</sub> supercrítico para incorporar cetonas en matrices, así como la efectividad de acción que presenta la matriz de liberación de los bioinsecticidas. La industria textil ha obtenido intensidades de tintado muy buenas con el colorante DR167 a bajas concentraciones mediante la impregnación con CO<sub>2</sub> supercrítico (Micó y col., 2011).



#### 4. OBJETIVOS

El presente estudio forma parte íntegra de los proyectos desarrollados en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos, específicamente en los llevados a cabo dentro del grupo de investigación “Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos”. El estudio realizado se basa en un análisis bibliográfico y en pruebas realizadas en el laboratorio.

El objetivo general que se persigue con este estudio es analizar el proceso de obtención de envases activos utilizados en la conservación de alimentos. Para obtener dichos envases se evalúa la posibilidad de emplear compuestos bioactivos extraídos a partir de la cáscara del limón en la impregnación de los polímeros, utilizando tecnología supercrítica. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los métodos de extracción más utilizados en la obtención de los compuestos bioactivos a partir de la cáscara de limón, descritos en la bibliografía.
2. Determinar experimentalmente el efecto de las variables de operación (presión, temperatura y porcentaje de etanol) en el rendimiento de extracción a partir de piel de limón, utilizando la extracción a alta presión.
3. Evaluar bibliográficamente los métodos de determinación de la capacidad antimicrobiana que presentan los aceites esenciales obtenidos frente a diferentes tipos de bacterias responsables de provocar efectos negativos sobre las propiedades organolépticas de los alimentos.
4. Analizar bibliográficamente los diferentes métodos de impregnación a partir del cual se obtiene un mayor rendimiento en el proceso de impregnación de los polímeros en estudio.

## 5. SOLUCIÓN TÉCNICA

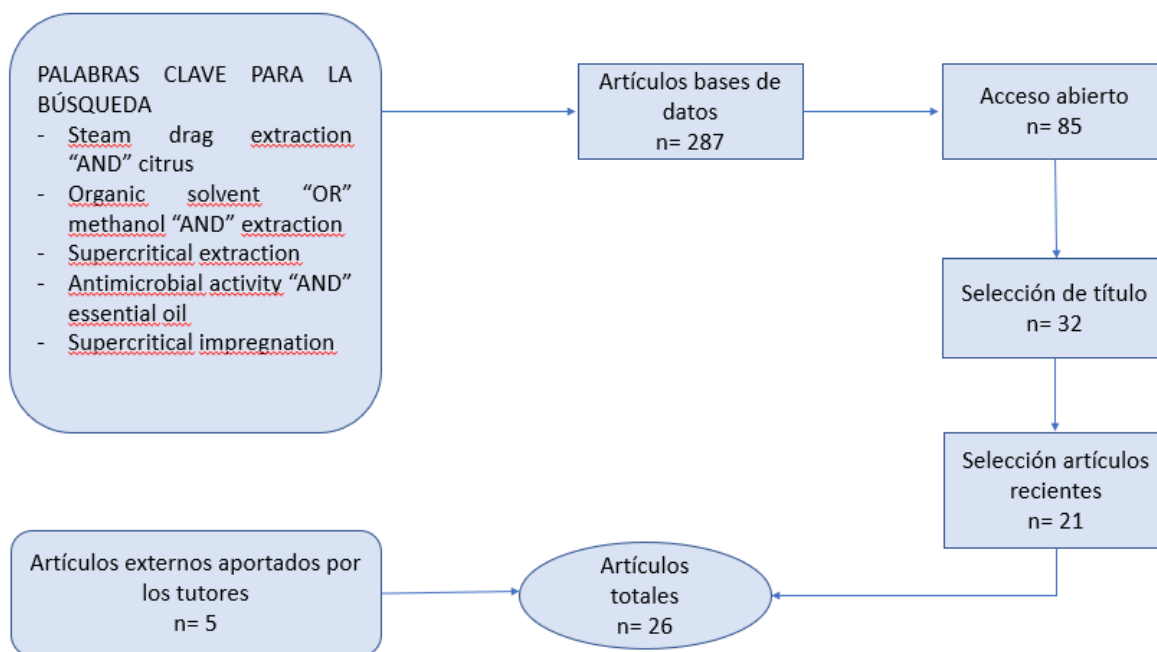
### 5.1 Materiales y métodos

En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica en el periodo de tiempo comprendido entre noviembre de 2019 y junio de 2020. Se han utilizado las bases de datos científicas Scopus, Science Direct, Scielo y Google Scholar aceptándose mayoritariamente artículos publicados a partir de 2014 aunque se han aceptado artículos de años anteriores debido a la relevancia de la información contenida para el presente estudio. Se han usado también los recursos electrónicos ofrecidos por la biblioteca de la Universidad de Cádiz.

Los artículos seleccionados principalmente han sido aquellos relacionados con el tema en estudio, prestando especial atención a los relacionados con los métodos de extracción, impregnación, cítricos y aceites esenciales. Las palabras claves se han introducido en inglés por ser el idioma universal en el ámbito científico y en castellano.

Los operadores lógicos más usados han sido “AND” y “OR” con el objetivo de conseguir una correcta combinación de palabras claves para obtener los artículos más específicos en el tema a tratar. La combinación de las palabras “extraction AND citrus” ofrecían un gran número de artículos al igual que la combinación “impregnation AND essential oil”. El conector “OR” se ha usado en muchas ocasiones para la unión de palabras con el mismo significado como por ejemplo “methanol” y “organic solvent”.

Mediante el diagrama de flujo adjunto a continuación se puede observar el proceso de selección de los artículos.



**Tabla 1.** Características de los estudios más relevantes incluidos.

REFERENCIA	TEMÁTICA	PALABRAS CLAVE	UTILIZACIÓN EN EL TFG
(Casado, 2018)	“Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor”	Destilación en corriente de vapor Extracción Aceite esencial	Se toma como referencia para describir el proceso experimental seguido en la extracción de compuestos bioactivos a partir del limón mediante la destilación en corriente de vapor
(Sandoval y Romero ,2017)	Extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de frutos cítricos de Nicaragua para la formulación de resina fenólica”	Solvente orgánico Extracción Cítricos	Se utiliza como guía para la descripción del proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de cítricos.
(Kim y Lim, 2020)	“Semi-continuous subcritical water extraction of flavonoids from <i>Citrus unshiu</i> peel: Their antioxidant and enzyme inhibitory activities”	<i>Citrus unshiu</i> peel Bioflavonoids Subcritical water extraction Hydrothermal hydrolysis products	Artículo de referencia para el proceso de extracción de flavonoides mediante líquidos presurizados
(Montero, 2009)	“Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del limón persa ( <i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	Limón persa Actividad antimicrobiana Bioconservación Funcionalidad	Se utiliza como base para el desarrollo del procedimiento experimental llevado a cabo para probar la actividad

			antimicrobiana de los extractos obtenidos de la variedad de limón estudiada
(Goñi y col., 2016)	“Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation”	Supercritical fluid impregnation Eugenol LLDPE Antioxidant activity Active packaging	Referencia principal para la descripción del proceso de impregnación de un polímero con sustancia bioactiva

Se incluyen únicamente en la Tabla 1 los trabajos fundamentales y mayormente descritos a lo largo del trabajo y que han servido como base para el presente estudio. El listado completo de las referencias bibliográficas utilizadas aparece en el apartado “Bibliografía”.

Con los resultados obtenidos de la búsqueda bibliografía descrita anteriormente, en este apartado se explican métodos existentes para la extracción de compuestos activos de limón. Dado que el trabajo incluye una parte experimental, también se incluye la descripción del equipo utilizado y la metodología de trabajo empleada en la extracción supercrítica a partir de cáscara de limón. Estas pruebas se realizaron en el laboratorio 3 “Nuevos procesos” del Instituto de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias IVAGRO de la Universidad de Cádiz.

A continuación, se describen las técnicas microbiológicas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de cáscara de limón y/o cítricos en general. Finalmente, se explica la metodología de trabajo empleada para la impregnación de aceites esenciales en diferentes polímeros utilizando la tecnología con CO<sub>2</sub> supercrítico.

### 5.1.1 Técnicas de extracción

#### 5.1.1.1 Arrastre por vapor

Es una técnica ampliamente utilizada para la separación de aceite esenciales de gran variedad de plantas entre las que destaca el anís (Leytón y col., 2016), clavo (Goyena y Fallis, 2019) y el limón, objeto del presente trabajo. Se trata de un proceso por el cual se separa mediante el uso de vapor de agua los componentes volátiles contenidos en la materia prima vegetal. Es el método convencional más usado actualmente debido a su sencillez y eficacia en la obtención de los extractos. Para ello, se hace pasar un flujo de vapor de agua generado externamente e inyectado por la parte inferior del matraz que contiene la materia prima, el cual arrastra los componentes de

interés. Para obtener el aceite esencial, se enfría y condensa el vapor obteniéndose una fase acuosa inmiscible con la fase orgánica que constituye el aceite esencial (Casado, 2018; Espinosa y Rocha, 2019).

Según Casado (2018) existen cuatro zonas perfectamente diferenciadas en el proceso de obtención de aceites esenciales mediante arrastre por vapor:

- **Zona de generación de vapor:** se produce el vapor de agua que alimenta al proceso.
- **Zona de destilación:** en ella se encuentra la materia prima. Se pretenden extraer los aceites esenciales mediante arrastre por vapor generado en la zona anterior.
- **Zona de condensación:** condensa los vapores de la zona de destilación. Se usa un tubo refrigerante Liebig por el que circula agua fría en contracorriente.
- **Zona de recogida:** es la parte donde se recolecta el destilado. Se trata de un embudo de decantación con un codo de vidrio final con abertura al ambiente para trabajar a presión atmosférica.

Autores como Vignola y col. (2020) y Medrano (2019) han aplicado esta técnica para la recuperación de los aceites esenciales presentes en la cáscara de limón y comprobar su poder antimicrobiano en *Staphylococcus aureus* y en bacterias benéficas como *Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014, bacterias patógenas como *Escherichia coli* ATCC 25922 y sobre *Leuconostoc mesenteroides* MS1, alterante de los alimentos.

El procedimiento experimental utilizado en esta técnica se describe a continuación:

La cáscara de limón una vez pelada y troceada se introduce en el matraz destilador el cual se encuentra conectado con el matraz generador. Este matraz se calienta con una manta calefactora para producir el vapor de agua necesario para arrastrar el aceite esencial del limón contenido en el matraz destilador. El vapor se introduce en la parte inferior del matraz destilador para que, al ascender, arrastre los componentes. Una vez que el vapor ha atravesado el matraz destilador y arrastra los componentes, se condensa y se obtiene el aceite esencial mezclado con agua. Ambas fases se separan mediante decantación obteniéndose un aceite esencial puro (Casado, 2018). En la Figura 5 se observa un equipo utilizado para esta extracción.



**Figura 5.** Equipo para la extracción mediante arrastre por vapor (Casado, 2018).

#### 5.1.1.2 Extracción con solventes orgánicos

Como referencia se describirá el método desarrollado recientemente por Sandoval y Romero (2017). El procedimiento experimental que estos autores llevaron a cabo para la extracción de compuestos fenólicos del limón mediante solventes sigue las siguientes etapas:

1. Pretratamiento de la muestra: Los procesos de extracción se ven influenciados de forma importante por las etapas previas de acondicionamiento de la materia prima. Un acertado diseño de estas etapas permite incrementar los resultados de rendimiento en las etapas posteriores de extracción. Igualmente, es importante seleccionar e identificar claramente las variedades y muestras que se estudian, su grado de madurez y su tamaño, dado que el resultado final, estará influenciado por estas variables. En el caso de los estudios de Sandoval y Romero (2017), emplearon frutos de rechazo sin importar el grado de madurez o tamaño, insistiendo únicamente en el estado fisiológico de su cáscara. Se emplearon tres tipos de limones diferentes para el estudio, limón real, limón sin semilla y limón criollo procedentes del mercado de Nicaragua. El pretratamiento que estos autores proponen parte del lavado con agua de la fruta, y el pelado de esta, el posterior triturado de la cascara, y el secado. Esta última operación se realiza en un horno durante varias horas, analizándose el efecto que esta operación tiene en el rendimiento final. En la Figura 6 se incluyen varias fotos de los equipos y etapas de pretratamiento.





**Figura 6.** Balanza y envase usado para lavar la cáscara de limón, equipo para triturado Trituradora Robot Coupe 2 ½ Qt, y horno utilizado para el secado de la cáscara de limón (Sandoval y Romero, 2017).

2. Etapa de extracción: Tras el secado, se realiza la extracción por maceración con tres solventes diferentes: acetona, metanol y hexano, cada uno con una concentración del 96 %. Otras variables de interés son el tiempo, así como la temperatura del proceso de extracción.
3. Etapa de recuperación del soluto: Tras los tiempos de extracción es necesario recuperar el disolvente y el soluto. En este caso se propone el filtrado con papel de filtro durante 30-40 minutos para separar las cáscaras del líquido. Para la separación del disolvente es conveniente acudir a la operación de destilación a vacío.

Estudios como el de Sepahpour y col. (2018) utilizan esta técnica para la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes de la cúrcuma, hojas de curry y jengibre. El estudio realizado por Do y col. (2014) utilizaron concentraciones del 50 %, 75 % y 100 % de metanol, etanol y acetona en agua para la extracción de compuestos antioxidantes, fenoles y flavonoides a partir de *Limnophila aromatica*, comúnmente usada en el sudeste asiático como hierba medicinal y especia.

Autores como Saleem y Saeed (2020) realizan la extracción con disolventes orgánicos a partir de diferentes materias primas. El proceso tiene una duración de dos horas y para la posterior obtención del extracto, se realiza una destilación para evaporar el disolvente. El extracto obtenido se evalúa posteriormente en bacterias patógenas, hongos filamentosos y levaduras.

#### 5.1.1.3 Extracción con fluido supercrítico

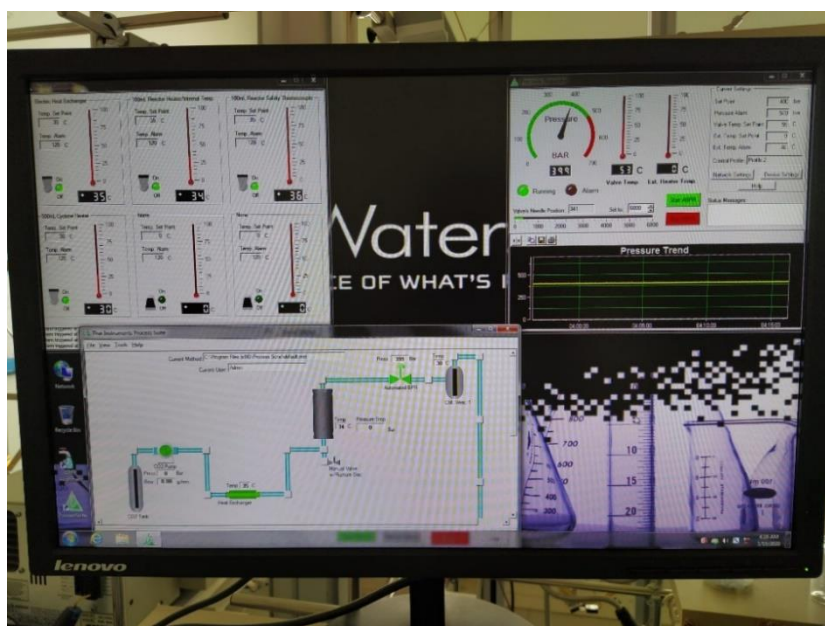
En este apartado se describe la parte experimental de este TFG. Esta se realizó en un equipo de alta presión de la firma Thar Technology (Pittsburg, PA; EE. UU), modelo SF500, dotado de un extractor de 500 mL de capacidad, un separador ciclónico de igual volumen y un sistema de 2 bombas de alta presión (para el CO<sub>2</sub> y el codisolvente) (Figura 7).





**Figura 7.** Equipo para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

Las variables de extracción se controlan mediante el software llamado ProcessSuite instalado en el ordenador. Las variables a controlar durante dicho proceso son la presión y temperatura de operación, así como los caudales de CO<sub>2</sub> y codisolvente.



**Figura 8.** Software ProcessSuite de control de las variables del proceso de extracción.

### i) Materia prima

Para este estudio se utilizó la cáscara del limón obtenida por mallas de 1 kg en el supermercado de la firma Mercadona. La cáscara está formada por una capa blanca más interna denominada albedo y una capa externa de color amarillo denominada flavedo. Se procedió a separar el flavedo



ya que es en esta parte de la cáscara del limón donde se encuentran la mayoría de los compuestos de interés a extraer. El albedo contiene impurezas que luego interfieren en los procesos posteriores de purificación del extracto por lo que se prescinde de ella.

El pelado de los limones se llevó a cabo de forma manual y posteriormente, las cáscaras se sometieron a secado extendiéndose sobre un papel de filtro como muestra la Figura 9. La temperatura de la habitación donde se dejó secar se encuentra alrededor de 24 °C y fueron necesarios 5 días para su secado completo. El objetivo del secado es retirar el agua contenida en la muestra y que influye negativamente en el rendimiento del proceso ya que la solubilidad del agua en CO<sub>2</sub> supercrítico es muy baja (~0,1 % peso/peso) (Khvalbota y col., 2020).



**Figura 9.** De izquierda a derecha: Cáscara de naranja fresca, cáscara de limón fresca y cáscara de limón en estado avanzado de secado.

Una vez seca toda la materia prima, se procede a su trituration mediante el uso de un triturador de la firma Thermomix con el objetivo de obtener un menor tamaño de partícula y así favorecer el contacto materia prima-disolvente que asegure un mayor rendimiento y eficacia del proceso. La materia prima se coloca en cartuchos elaborados con papel de filtro, lo que facilita la recogida y limpieza del equipo una vez finalizada la extracción.

## ii) Metodología de extracción

Para realizar una extracción a alta presión de la piel de limón, inicialmente se enciende el criotermostato y se espera a que la temperatura alcance los 5 °C. El CO<sub>2</sub> que sale de la bombona se convierte en líquido y puede ser impulsado por la bomba P-50. Mientras tanto, se carga el extractor con, aproximadamente, 70 g de materia prima y se establecen las condiciones de presión, temperatura y caudal de CO<sub>2</sub> y etanol, en caso de que las pruebas se realicen con codisolvente. El tiempo de extracción se comienza a contar una vez que las condiciones de operación se han alcanzado en el sistema.

Una vez transcurrido el tiempo establecido, se desconectan los sistemas de termostatación, se detienen las bombas de CO<sub>2</sub> y codisolvente y se cierra la botella de CO<sub>2</sub>. Después, manualmente, se abre lentamente la válvula BPR, hasta que la presión se igualara con la atmosférica. El extracto se recoge por la parte inferior del separador ciclónico y se pesa.

El estudio de la influencia del disolvente de extracción, presión y temperatura de operación se llevó a cabo mediante la planificación de un diseño factorial multinivel, que evalúa el comportamiento de tres factores, cada uno de ellos a 2 niveles, uno bajo y otro alto (Tabla 2). Los resultados obtenidos se procesaron haciendo uso del software estadístico STATGRAPHICS Plus 18. El tiempo de extracción permaneció constante (2 horas).

**Tabla 2.** Valores empleados para llevar a cabo el diseño factorial.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Disolvente	CO <sub>2</sub> puro (25 g/min)	CO <sub>2</sub> +etanol (23 g/min CO <sub>2</sub> y 2 g/min etanol)
Presión (bar)	100	400
Temperatura (°C)	35	55

### iii) Rendimiento de extracción

Este parámetro permite determinar la masa de extracto seco obtenido tras la extracción en función de la cantidad de materia prima empleada. El procedimiento se realizó cuatro veces para estimar la desviación de los resultados. Consistió en hallar, por diferencia de peso, la masa de extracto seco obtenido en una alícuota conocida. Luego, este resultado se refiere al volumen total de extracto obtenido tal como se muestra en la siguiente expresión (Ecuación 1).

$$R (\%) = \frac{V_{te} \times M_{es}}{V_a \times M_{pi}} \times 100 \quad [1]$$

siendo  $V_{te}$  el volumen total del extracto obtenido (mL),  $M_{es}$  la masa de extracto seco (g),  $V_a$  el volumen de la alícuota (3mL) y  $M_{pi}$  la materia prima inicial tomada para extracción (g).

#### 5.1.1.4 Líquidos presurizados

Diversos estudios utilizan la técnica de líquidos presurizados para llevar a cabo la extracción de los componentes bioactivos a partir de diferentes materias primas.

Según Kim y Lim (2020), la extracción de flavonoides en semicontinuo a partir de la piel de mandarina se realizó mediante agua presurizada. La piel troceada se introduce en un reactor de acero inoxidable el cual tiene un filtro en cada salida con un tamaño de poro de 5 µm. El extractor

está conectado a un horno para mantener la temperatura constante y a una bomba que hace pasar el agua a la velocidad establecida. La presión está controlada mediante un regulador de temperatura. El porcentaje de cada extracto se determina en relación al contenido total de sólidos después de su secado a 105 °C.

Otro estudio como el de Plaza y Marina (2019) contempla la extracción de compuestos fenólicos de diferentes fuentes como plantas y subproductos industriales mediante agua caliente presurizada (PHWE). Se emplea normalmente una temperatura de extracción entre los 80-150 °C y un tiempo de extracción entre 1-60 minutos. Además, se emplea esta técnica para la obtención de diterpenos glicósidos a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* con una temperatura de 100 °C y un tiempo óptimo de extracción de 15 minutos aportando una velocidad de caudal constante de 1,5 mL/min.

Ko y col. (2011) proponen la extracción mediante un extractor acelerado con disolventes. Para ello, hacen uso de agua Mili-Q como único disolvente para extraer quercetina a partir de la piel de cebolla. Se emplea un extractor de acero inoxidable a una presión entre 90-131 bar y a una temperatura entre 100-190 °C. Se realiza entre una extracción y la siguiente, una purga con nitrógeno gas y el extracto final acuoso se recolecta en viales de vidrio. El tiempo de extracción oscila entre los 5 y 30 minutos.

En su estudio, Sharma y col. (2019), realizan la extracción con agua en estado subcrítico para la obtención de flavonoides polimetoxilados a partir de cítricos. Emplea para ello una temperatura de 200 °C durante 60 minutos para una rápida obtención de los flavonoides.

El estudio de Lopresto y col. (2014) utilizó el hexano como solvente para realizar la extracción del D-limoneno partir de cáscaras de limón, utilizadas como matriz. Se emplea un reactor de 100 mL con agitador mecánico a 200 rpm y manta calefactora. El nitrógeno se emplea para evitar la oxidación del limoneno.

### 5.1.2 Capacidad antimicrobiana de los extractos

Son varias las técnicas que aparecen recogidas en la literatura para determinar la capacidad antimicrobiana en extractos de limón.

El estudio realizado por Montero (2009), se llevó a cabo en el “Laboratorio de Investigación Básica y Terapia Celular del hospital San José, perteneciente a la Facultad de Medicina del Instituto Tecnológico de Monterrey”. Este trabajo evaluó la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de limón de las variedades *Citrus volkameriana* y *Citrus latifolia*, conocido como limón persa, en las etapas de desarrollo precosecha correspondiente a 30, 60 y 90 días. El aceite esencial de la cáscara de limón se obtuvo mediante hidrodestilación con un equipo Clevenger (Cerpa y col., 2007).

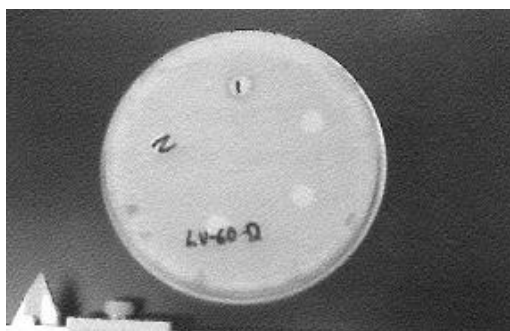
Para ello se prepararon diluciones de 10, 1 y 0,1 % de aceite esencial en etanol absoluto. Para las pruebas microbianas se utilizaron tanto bacterias Gram + como Gram -. Las especies de bacterias Gram + evaluadas fueron las siguientes: *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Las bacterias Gram - evaluadas fueron *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*. Todas estas bacterias fueron donadas por el Laboratorio de Unidad de Medicina Familiar No.32 IMSS, Cd Guadalupe, N.L.

Como las bacterias se encontraban liofilizadas se reactivaron en tubos con Caldo Soya Tripticasa (CST) y se inocularon en el medio, permaneciendo en incubación durante 24 horas a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, las bacterias Gram + se sembraron en placas Petri con Agar Sangre Base (ASB) y las Gram - con Agar Eosina Azul (EMB) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

La prueba de la capacidad antimicrobiana de los extractos se evaluó por medio del método de difusión en disco. Las bacterias se inocularon con ayuda de un hisopo estéril introducido en el caldo de bacterias una sola vez y posteriormente extendiéndose en placas Petri con Agar Mueller Hinton (AMH) mediante siembra por estría para inocular toda la superficie de la placa.

Una vez realizada esta parte, se procedió a colocar 10 µL de cada extracto en discos de papel de filtro esterilizados de 40 µm de tamaño de poro y un diámetro de 6 mm. Un disco se inoculó con etanol absoluto a modo de control negativo y se dejó evaporar. Estos discos se colocan en las placas AMH inoculadas de forma que queda una placa con 5 discos de la muestra de aceite esencial de *C. volkameriana* y *C. latifolia* como muestra la Figura 10. Los discos contienen el control negativo con etanol absoluto, aceite esencial al 100 % y las tres diluciones de 10, 1 y 0,1 % de aceite esencial respectivamente.



**Figura 10.** Placa para la prueba antimicrobiana (Montero, 2009).

Las lecturas correspondientes se realizaron pasadas 18 y 24 horas midiendo el diámetro del halo de inhibición provocado por los aceites esenciales, incluyendo el disco. La no existencia de halo se cuantificó como 0 y la prueba se realizó por triplicado para ambos casos.

El estudio llevado a cabo por Pérez y col. (2018) analiza la actividad antimicrobiana de los extractos de piel de limón criollo contra *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladiolis*. El aceite esencial se obtiene mediante hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) usando un horno convencional como fuente de radiación con un tiempo de extracción de 30 minutos. Para cada extracto se prepara diferentes diluciones en un rango entre 1 y 4000 ppm. Las bacterias se crecen sobre caldo King B y se ajusta para que 100 µL tengan una concentración entre 0,1 y 0,08 de absorbancia medida a 625 nm.

Con el objetivo de comprobar la actividad antibacteriana de los extractos, se usa una placa de 96 pocillos agregando a cada uno 100 µL de la suspensión ajustada de bacterias con el mismo volumen de tratamiento incubándose a  $35 \pm 2$  °C por 20 horas a 160 rpm. Se comprueba el crecimiento de las bacterias a diferentes concentraciones de extractos. La actividad antimicrobiana se comprobó con el ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) adicionando a cada pozo 50 µL de una solución de 0,5 mg/mL de MTT tanto para los controles como para los tratamientos incubándose nuevamente por 2 horas. Transcurrido el tiempo se descarta el sobrenadante y se agrega a cada pozo 100 µL de DMSO concentrado, se resuspende y se determina la densidad óptica a 492 nm. A continuación, se toman 5 µL de cada pozo y se adiciona 15 mL de agua destilada estéril inoculándose 10 µL sobre agar King B. incubándose 3 días a  $35 \pm 2$  °C calculándose el porcentaje de inhibición por unidades formadoras de colonia mediante la ecuación 2:

$$\text{Porcentaje de Índice Bactericida (\%I.B.)} = 100 - \frac{UFC_{\text{experimental}}}{\text{Control}} * 100 \quad [2]$$

Con esto se comprueba la viabilidad celular a través de la actividad mitocondrial ya que la enzima succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias, reducen el MTT a cristales de formazán, siendo proporcional a las células vivas (Simarro, 2019).

El estudio de Argote-vega y col. (2017) realiza la extracción del aceite esencial de eucalipto, cáscara de limón y mandarina mediante hidrodestilación. Para comprobar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* también utilizan el ensayo de MTT.

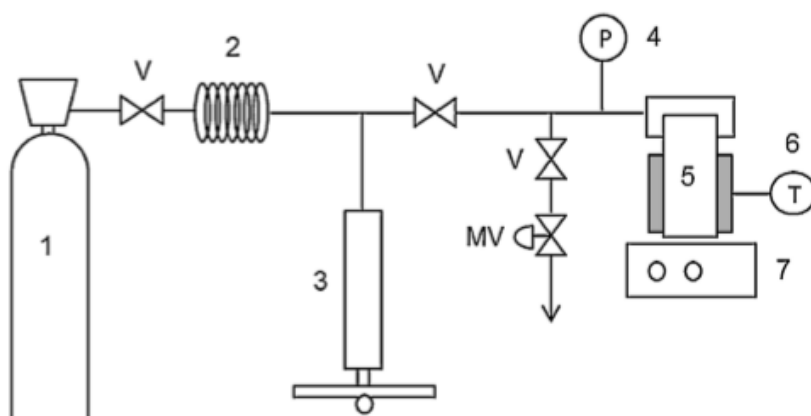
Los tres métodos de determinación de la actividad antimicrobiana tienen en común la hidrodestilación para obtener los aceites esenciales a diferencia de que el estudio de Montero (2009) y de Argote-vega y col. (2017), tienen como fuente de emisión el calor y el estudio de Pérez y col. (2018) tiene las radiaciones microondas como fuente. El primer estudio analizado difiere de los otros de forma que no utiliza ningún reactivo intermedio para determinar la actividad antimicrobiana ya que se determina por halos de inhibición mientras que en los demás, se utiliza el ensayo de MTT.

### 5.1.3 Técnica de impregnación

El proceso de impregnación con CO<sub>2</sub> supercrítico es una técnica ampliamente utilizada en los procesos de impregnación de matrices con sustancias bioactivas y debido a su simplicidad a escala de laboratorio, se lleva a cabo en discontinuo. Para la incorporación del compuesto activo en la matriz polimérica, ambos se colocan en la misma celda, pero separados físicamente. La celda es sometida a diferentes condiciones de operación como tiempo de impregnación, velocidad de despresurización, temperatura y presión de CO<sub>2</sub> entre otros. Un aspecto importante es la necesidad de agitación en la celda para mejorar la transferencia de masa en el proceso, pero no es fácil de lograr en celdas a alta presión.

A continuación, se describen diferentes métodos y equipos descritos en la bibliografía para realizar la impregnación de aceites esenciales.

Goñi y col. (2016) llevan a cabo un estudio en el que utilizan el CO<sub>2</sub> supercrítico para la impregnación con eugenol utilizando como polímero un film comercial de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE). El experimento se lleva a cabo a escala de laboratorio en un equipo a alta presión como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Equipo de impregnación a alta presión. 1, Bombona CO<sub>2</sub>; 2, serpentín de refrigeración; 3, generador de presión; 4, manómetro; 5, celda impregnación; 6, controlador de temperatura; 7, agitador magnético; V, válvulas; MV, micro válvula dosificadora (Goñi y col., 2016).

El equipo consta de una celda de acero inoxidable de 50 cm<sup>3</sup> de volumen interno capaz de soportar presiones por encima de 25 MPa y temperaturas superiores a 200 °C. La celda es calentada externamente por una chaqueta de aluminio y conectada mediante una abrazadera a un controlador de temperatura.

Para comenzar, se carga un volumen determinado de eugenol dependiendo de las condiciones de operación en la celda junto con un imán magnético recubierto de teflón para la agitación. Las

muestras de film se introducen en la celda en una malla metálica para evitar que se pegue a las paredes en la despresurización y se mantenga en posición vertical la cual es importante para permitir que el eugenol se deposite en su superficie durante la despresurización. Una vez cerrada la celda, el CO<sub>2</sub> se licua a 2 °C con ayuda de un baño de agua fría y se bombea hacia la celda con una válvula manual o un generador de presión. Se activa la resistencia para aumentar la temperatura y permitir el equilibrio del sistema con todas las válvulas cerradas y sin agitación. Durante esta etapa se corrigen las pequeñas desviaciones de presión con la bomba manual hasta su estabilización en el valor deseado.

La impregnación se realiza a unos valores constantes de presión, temperatura y agitación y durante un periodo concreto de tiempo. Transcurrido este tiempo, tanto el calentador como el agitador se apagan y se despresuriza la celda a una velocidad controlada gracias a la micro válvula dosificadora. Tras la despresurización, la celda se abre y se extrae cuidadosamente el film y se limpia la superficie con papel para eliminar los posibles restos de eugenol.

Se determina la cantidad de eugenol que ha sido incorporada en la matriz de polietileno mediante gravimetría en una balanza de precisión y se calcula el rendimiento de la impregnación según la ecuación 3.

$$R (\%) = \frac{m_f - m_0}{m_0} \times 100 \quad [3]$$

siendo  $m_0$  la masa inicial polímero y  $m_f$  la masa final del polímero.

En este estudio, la impregnación se realiza a unos valores de presión de 10, 12 y 15 MPa con una velocidad de despresurización de 0,5, 1 y 5 MPa/min y a una temperatura constante de 45 °C. El tiempo de impregnación es de 4 horas sin contar con el tiempo de despresurización posterior.

Estudios como el de Milovanovic y col. (2015) realizan la impregnación de timol en matrices de acetato de celulosa con CO<sub>2</sub> supercrítico. Se lleva a cabo en una cámara a alta presión donde el timol se introduce en la parte inferior del recipiente en un contenedor de vidrio con un filtro en la parte superior para controlar las salpicaduras que puedan producirse en la descompresión. Las perlas de acetato de celulosa se introducen en una red porosa por encima del timol. Una vez que el recipiente se cierra y se calienta, se introduce el CO<sub>2</sub> supercrítico por la parte superior del recipiente y se eleva la temperatura.

Los experimentos se llevan a cabo por triplicado a una presión de 10 y 20 MPa, a una temperatura de 35 °C y con un tiempo de impregnación que oscila entre las 2-44 horas. El timol se suministró en exceso durante todo el proceso. La velocidad de despresurización del sistema fue de 0,3 MPa/min. La masa de timol impregnada se determinó por gravimetría siguiendo la ecuación 3.

Ambos métodos anteriormente descritos difieren significativamente en el tiempo necesario para llevar a cabo la impregnación. En el estudio de Goñi y col. (2016) se emplea únicamente un valor fijo de temperatura y se mantiene la agitación mientras que en el estudio de Milovanovic y col. (2015) se utilizan dos valores de temperaturas para la impregnación de manera que en este estudio se obtiene diferentes rendimientos según la temperatura pudiéndose optimizar posteriormente el proceso según el rango de temperatura. En este último estudio no se tiene en cuenta la agitación del sistema.

El estudio de Goñi y col. (2017) mantiene el mismo procedimiento experimental que en el desarrollado por Goñi y col. (2016) a diferencia de que el componente a impregnar en este caso se trata de R-(+)-pulegona, principal componente del aceite esencial del género *Satureja viminea* (Stashenko y col., 2017) y timoquinona. La matriz polimérica para impregnar se trata también de polietileno lineal de baja densidad. Para este caso, después de realizar la impregnación, los polímeros se pesan después de esperar al menos 10 minutos una vez realizada la despresurización.

Gran cantidad de estudios utilizan esta tecnología para la impregnación de matrices poliméricas para su posterior uso en diferentes campos. Mosquera y col. (2019) realizan la impregnación de matrices de poliamida con eugenol con CO<sub>2</sub> supercrítico para su aplicación como hilo dental. Sin embargo, el estudio realizado por García-Casas y col. (2019) realizan la impregnación de micropartículas porosas de sílica con quercetina de gran poder antioxidante.

Estudios como el de Milovanovic y col. (2018) y Franco y col. (2019) llevan a cabo la impregnación de diferentes matrices con sustancias bioactivas naturales para su posterior uso en envases activos. El primer estudio realiza la impregnación de polímeros de ácido láctico/ $\alpha$ -caprolactona con timol mientras que, en el segundo estudio, se impregnan polímeros de polietileno tereftalato/ polipropileno con  $\alpha$ -tocoferol. El aceite esencial de clavo se usa para la impregnación de polímeros de polietileno lineal de baja densidad para su posterior uso como envases activos en la conservación de alimentos como trata el estudio realizado por Medeiros y col. (2018).

Se observa la gran cantidad de posibilidades que existen en cuanto a la naturaleza de los polímeros a impregnar, así como las sustancias bioactivas que pueden ser incorporadas a los polímeros. Se ofrece un amplio abanico de posibilidades tanto para la creación como mejora de nuevas tecnologías en los diferentes campos de la ciencia.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA SOLUCIÓN TÉCNICA

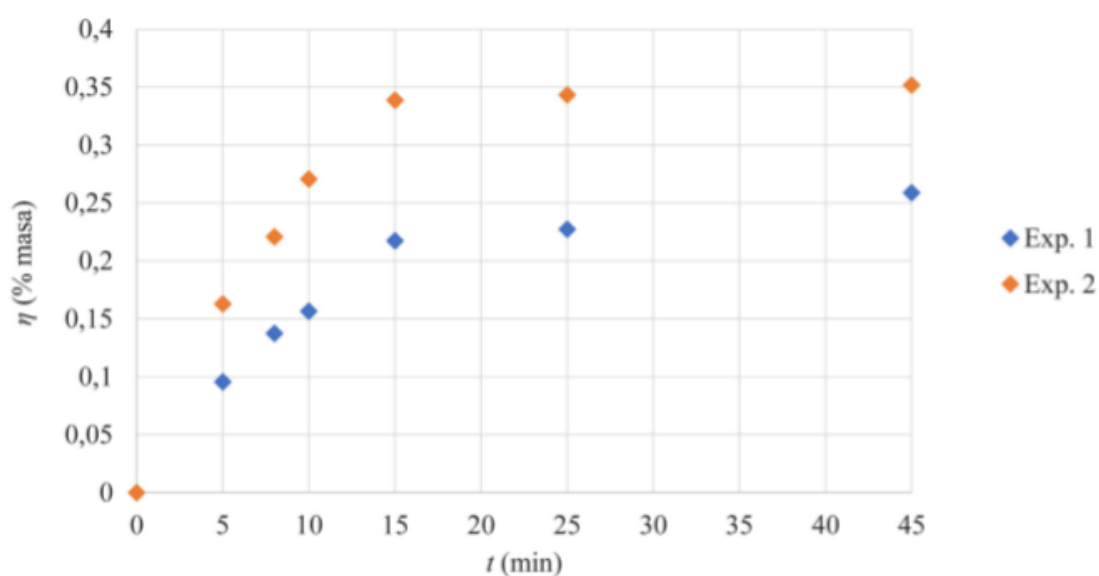
En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la bibliografía descrita anteriormente, los resultados obtenidos experimentalmente en el laboratorio, así como la discusión de estos.



### 6.1 Rendimiento extracción mediante arrastre con vapor

En el estudio de (Casado, 2018) se realizan dos pruebas de extracción del aceite esencial de limón mediante arrastre con vapor. El tiempo de extracción se establece en 45 minutos tomando muestras del aceite extraído a diferentes tiempos de 5, 8, 10, 15, 25 y 45 minutos. La cantidad de limón dispuesta para la extracción es de 270 gramos y una cantidad de agua de 4 litros. Se trabaja a presión atmosférica y con un caudal de agua de refrigeración establecido en un rango entre 0,33-0,39 L/min.

La Figura 12 representa el rendimiento de las dos extracciones realizadas en las mismas condiciones con cáscara de limón.

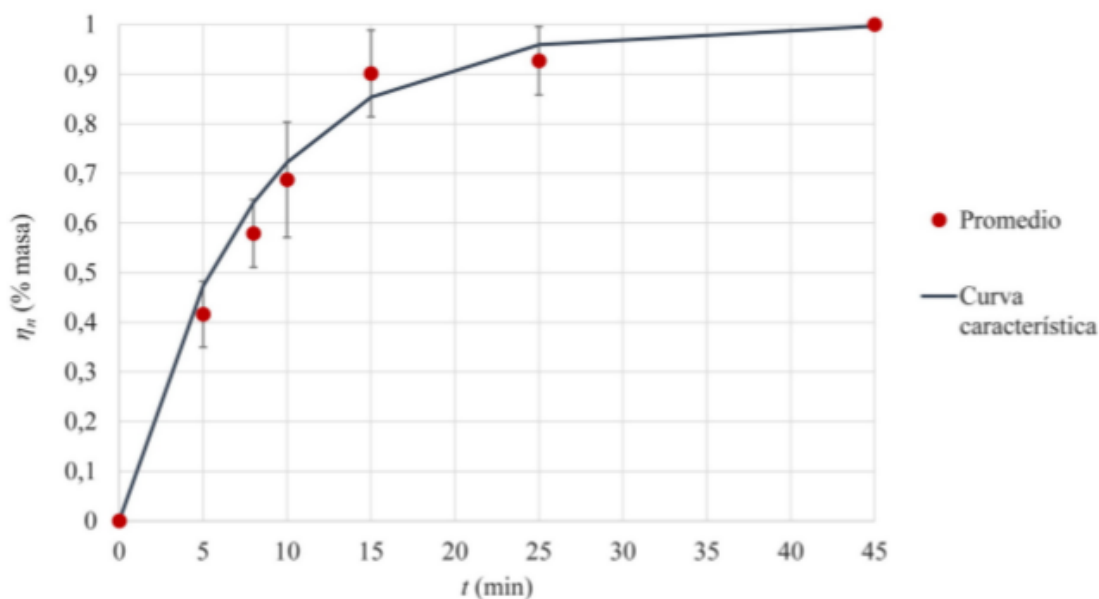


**Figura 12.** Rendimiento de la extracción con corriente de vapor de cáscara de limón (Casado, 2018).

Se observa una diferencia considerable de rendimientos en ambas extracciones, estableciéndose un rendimiento promedio para ambos experimentos del  $0,31 \pm 0,07\%$ .

Se puede observar la tendencia general que sigue la extracción mediante la curva característica en la Figura 13, la cual responde a la siguiente expresión:

$$\eta_n = 1 - e^{-0,3 \cdot t}$$



**Figura 13.** Curva característica extracción cáscara de limón mediante corriente de vapor (Casado, 2018).

Según lo expuesto en Casado (2018), el rendimiento obtenido a partir de la extracción con corriente de vapor de cáscara de limón presenta unos valores por debajo de la media consultada en la bibliografía, pudiendo interferir en el resultado del rendimiento la variedad del limón, la madurez, el estado fisiológico del limón y el proceso de pretratamiento de la muestra. Además, factores tales como las condiciones climáticas, el origen de procedencia y la época del año en que se realiza la cosecha de la fruta influyen directamente en el rendimiento obtenido.

## 6.2 Rendimiento extracción con solventes orgánicos

Sandoval y Romero (2017) analizan el proceso de extracción de fenoles con acetona, metanol y hexano a una temperatura de 25 °C durante 2 días y, por otra parte, a 76 °C durante 4 horas. En la Tabla 3 se observan los resultados obtenidos en las extracciones tanto de la cáscara seca como húmeda.

**Tabla 3.** Rendimiento de las extracciones de fenoles con diferentes solventes orgánicos (Sandoval y Romero, 2017).

EXTRACCIÓN a 25°C						
Disolvente	Cítrico	Cáscara (g)	Cantidad extraída (g)		Rendimiento (%)	
			Cáscara seca	Cáscara húmeda	Cáscara seca	Cáscara húmeda

<b>Metanol (150 mL)</b>	<b>Limón real</b>	50	18,6	23,8	37,2	47,6
	<b>Limón sin semilla</b>	50	13,7	15,2	27,4	30,4
	<b>Limón criollo</b>	50	12,1	15,6	24,2	31,2
<b>Acetona (150 mL)</b>	<b>Limón real</b>	50	17,5	18,1	35,0	36,2
	<b>Limón sin semilla</b>	50	14,4	16,9	28,8	33,8
	<b>Limón criollo</b>	50	12,6	13,4	25,2	26,8
<b>Hexano (250 mL)</b>	<b>Limón real</b>	100	3,6	4,9	3,6	4,9
	<b>Limón sin semilla</b>	100	2,2	4,5	2,2	4,5
	<b>Limón criollo</b>	100	1,8	2,8	1,8	2,8

**EXTRACCIÓN a 76°C**

<b>Disolvente</b>	<b>Cítrico</b>	<b>Cáscara (g)</b>	<b>Cantidad extraída (g)</b>		<b>Rendimiento (%)</b>	
			<b>Cáscara seca</b>	<b>Cáscara húmeda</b>	<b>Cáscara seca</b>	<b>Cáscara húmeda</b>
<b>Metanol (150 mL)</b>	<b>Limón real</b>	50	18,6	26,8	37,2	53,6
	<b>Limón sin semilla</b>	50	12,3	18,7	24,6	37,4
	<b>Limón criollo</b>	50	13,7	16,3	27,4	32,6
<b>Acetona (150 mL)</b>	<b>Limón real</b>	50	17,8	26,1	35,6	52,2
	<b>Limón sin semilla</b>	50	16,1	21,3	32,2	42,6
	<b>Limón criollo</b>	50	15,3	19,8	30,6	39,6
<b>Hexano (250 mL)</b>	<b>Limón real</b>	100	4,9	7,3	4,9	7,3
	<b>Limón sin semilla</b>	100	6,3	8,9	6,3	8,9
	<b>Limón criollo</b>	100	1,8	4,2	1,8	4,2

El rendimiento se calcula mediante la división del peso de fenoles obtenidos entre el peso de la cáscara pesada al inicio de la extracción.

Se determinaron los fenoles por el método Folin Ciocalteu el cual presenta una mezcla de ácido fosfotúngico y fosfomolibdico en igual proporción. Los fenoles reducen a estos ácidos cambiando de coloración amarilla a azul.

Se observa que para ambas extracciones se obtiene mayor cantidad de fenoles a partir de la cáscara húmeda de todas las variedades de limón. Considerando el tiempo como un factor importante en el proceso global de un proyecto, el uso de cáscaras húmedas ofrece una reducción de tiempo que consecuentemente conducirá a una disminución de los costes.

Aunque la extracción con hexano se realiza con una mayor cantidad de solvente y de cáscaras, se obtiene el menor rendimiento para ambas extracciones y para los tres tipos de limones. El mayor rendimiento para la extracción de fenoles de limón real se obtiene a partir de la extracción de cáscara húmeda a 76 °C con metanol como disolvente orgánico. Para el caso del limón sin semilla y del limón criollo se obtiene mayor rendimiento mediante la extracción a partir de cáscara húmeda a 76 °C con acetona como disolvente orgánico.

Se obtiene un mayor rendimiento tanto para cáscara seca como húmeda de todas las variedades y con todos los disolventes cuando la extracción se realiza a 76 °C exceptuando la extracción a partir de cáscara seca a 25 °C con metanol de forma que se observa una mayor influencia de la temperatura que del tiempo de extracción para obtener mejores rendimientos. Se puede deber a desviaciones en el proceso experimental o en la cuantificación de los fenoles que conduzcan a dicha variación ya que la tendencia general es la obtención de mayores rendimientos a 76 °C. Las extracciones realizadas a 76 °C tienen una duración de 4 horas por lo que influye directamente en el tiempo del proceso acortando los tiempos globales e influyendo en los costes del proceso a diferencia de las extracciones a 25 °C, los cuales presentan una duración de 48 horas.

En el caso del estudio de Sepahpour y col. (2018), se utiliza como disolventes orgánicos metanol, etanol y acetona a una concentración del 80 % en agua para la extracción de compuestos antioxidantes a partir de cúrcuma, hojas de curry y jengibre. La acetona resultó ser el mejor disolvente para la extracción de compuestos antioxidantes a partir de cúrcuma. Por el contrario, el metanol y etanol resultaron ser los mejores disolventes para la extracción a partir de hojas de curry y jengibre siendo el agua el disolvente con menor valor de extracción en comparación con los disolventes orgánicos.

Para el estudio de Do y col. (2014), la mayor cantidad tanto de antioxidantes, fenoles como de flavonoides se extrajeron con el 100 % de etanol como disolvente mientras que la menor cantidad se extrajo con agua.

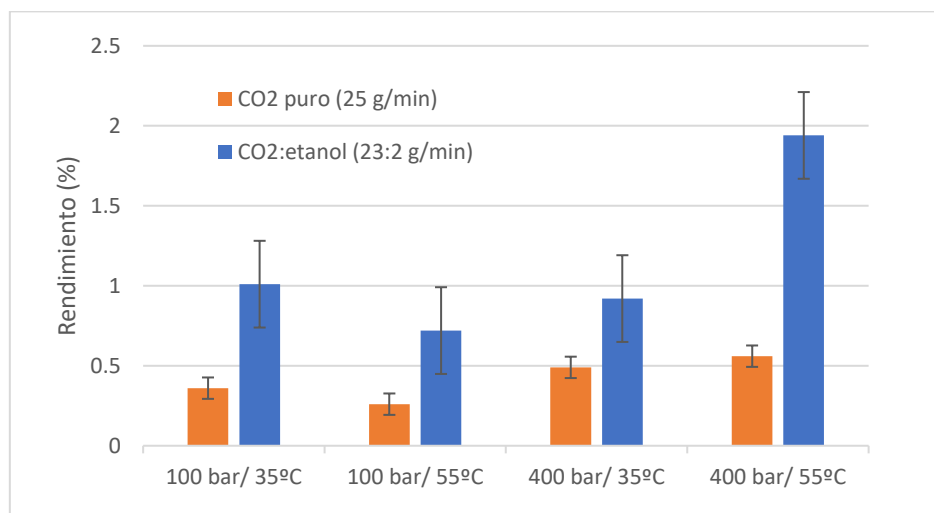
Los resultados obtenidos por Saleem y Saeed (2020) a partir de acetato de etilo, metanol, etanol y agua destilada como disolventes orgánicos para la extracción de compuestos de desechos de naranja, limón y plátano establecen que el agua destilada ofrece un mayor rango de extracción seguido de metanol, etanol y por último, acetato de etilo. La capacidad disolvente del agua puede deberse a su naturaleza polar convirtiéndola en el mejor disolvente.

### 6.3 Rendimiento experimental de la extracción supercrítica

La extracción de los compuestos de la cáscara del limón se ha realizado a valores diferentes de temperatura y presión puesto que una pequeña variación en ellos provoca una variación en la capacidad disolvente del CO<sub>2</sub> supercrítico (Prieto, 2019). El caudal másico de CO<sub>2</sub> se fija en 25 g/min para las cuatro primeras extracciones. Para aumentar la capacidad de extracción de los compuestos polares, se ha utilizado un 8 % de etanol como codisolvente.

Se ha empleado 35 °C y 55 °C como valor bajo y alto de temperatura respectivamente. El valor bajo de presión se establece en 100 bar mientras que el valor alto, en 400 bar. Cada experimento se realiza por triplicado y se calcula el rendimiento por diferencia de masas utilizando para ello una alícuota de 3 mL, según la ecuación 1.

Los datos obtenidos experimentalmente se muestran en la Figura 14 donde se representan ambos tipos de extracciones, con CO<sub>2</sub> puro y con una mezcla CO<sub>2</sub> + codisolvente.



**Figura 14.** Representación de los rendimientos de la extracción supercrítica de cáscara de limón.

Estudios como el de Curi y col. (2018) establecen que el rendimiento de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico disminuye al aumentar la presión debido a que aumenta la densidad provocando una disminución en la interacción entre fluido y matriz. Por otra parte, se establece que un aumento de la temperatura provoca un aumento del rendimiento de extracción debido al aumento de la presión de vapor de los compuestos extraíbles presentes en la materia prima.

Por otro lado, Casas y col. (2005) indican que, un aumento de la temperatura, a presión constante de 100 bar resultó ser perjudicial para el proceso de extracción. Este fenómeno se atribuye a la disminución de la densidad del fluido supercrítico y, por lo tanto, a su poder disolvente. Sin embargo, a mayor presión (500 bar) se observa un aumento del rendimiento con la temperatura

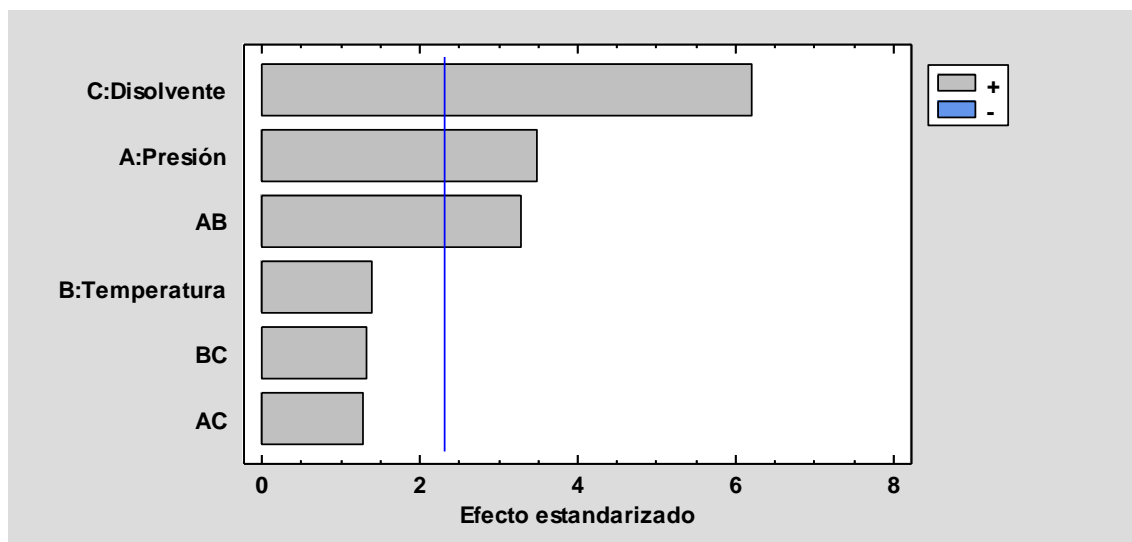
del proceso de extracción debido al aumento de la presión de vapor de las sustancias extraídas. Este aumento de la presión de vapor compensa la disminución de la densidad del dióxido de carbono supercrítico.

Los resultados experimentales obtenidos no coinciden con los resultados de Curi y col. (2018) pero sí con los de Casas y col. (2005) ya que como se puede observar en la Figura 14, al aumentar la presión desde 100 hasta 400 bar se produce un aumento del rendimiento tanto para el CO<sub>2</sub> puro como para la mezcla con etanol. El aumento de la temperatura provoca un aumento del rendimiento cuando se trabaja a altas presiones (400 bar) provocado por el aumento de la presión de vapor de los compuestos extraídos. Sin embargo, cuando se trabaja a bajas presiones (100 bar) el efecto de la temperatura es el contrario. A mayores temperaturas disminuye el rendimiento como consecuencia de la disminución de la densidad del CO<sub>2</sub> en estado supercrítico y este es el efecto que predomina a presiones de 100 bar.

Se comprueba que la extracción con CO<sub>2</sub> + etanol aumenta significativamente el rendimiento de la extracción en comparación con la extracción con CO<sub>2</sub> puro gracias al aumento del poder disolvente que ofrece el etanol.

Para comprobar desde el punto de vista estadístico la significación de las variables estudiadas en el proceso se hace el análisis del diseño de experimentos utilizando el software Statgraphics 18. Es necesario aclarar que en este diseño se han utilizado dos variables cuantitativas: presión y temperatura; la variable disolvente de extracción se ha convertido en una variable discreta asignándole, en el diseño el valor bajo (-1) cuando se utiliza CO<sub>2</sub> puro y el valor alto (+1) cuando se emplea la mezcla CO<sub>2</sub>+ 8 % de etanol.

La figura 15 muestra los resultados del gráfico de Pareto. Las variables: disolvente, presión y la interacción presión-temperatura influyen significativamente en el proceso y de forma positiva. Ello corrobora que los mejores rendimientos de extracción se obtienen al utilizar como disolvente la mezcla CO<sub>2</sub> + etanol a 400 bar y 55 °C de temperatura. Todos estos resultados se confirman con la Tabla 4 (Tabla ANOVA) donde el grado de significación de cada factor aparece descrito por un valor de probabilidad (P) de forma que cuando un factor presenta un P-valor menor que 0,05, se puede concluir que dicho factor influye de forma significativa en el proceso. De esta forma, gracias a este estudio se encontró una ecuación (Ecuación 4) que relaciona los parámetros de presión, temperatura y tipo de disolvente con el rendimiento de extracción.



**Figura 15.** Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción del proceso estudiado.

**Tabla 4.** Análisis de Varianza para el rendimiento de extracción del proceso estudiado.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Presión	0,690977	1	0,690977	12,14	0,0083
B:Temperatura	0,109727	1	0,109727	1,93	0,2024
C:Disolvente	2,1941	1	2,1941	38,56	0,0003
AB	0,614264	1	0,614264	10,79	0,0111
AC	0,0922641	1	0,0922641	1,62	0,2387
BC	0,0984391	1	0,0984391	1,73	0,2249
bloques	0,00170156	1	0,00170156	0,03	0,8670
Error total	0,455262	8	0,0569078		
Total (corr.)	4,25674	15			

$$R = 1,52396 - 0,00449 \cdot P - 0,02437 \cdot T - 0,10921 \cdot D + 0,00013 \cdot P \cdot T + 0,00050 \cdot P \cdot D + 0,00784 \cdot T \cdot D \quad (4)$$

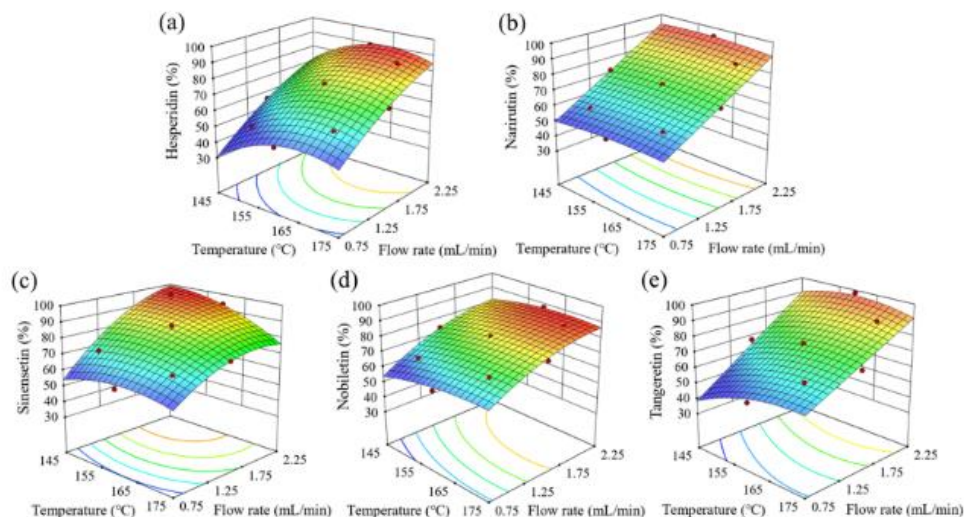
siendo R el rendimiento de extracción (%), P la presión en bar, T la temperatura en °C y D el disolvente que toma los valores (-1) si se utiliza CO<sub>2</sub> y (+1) para la mezcla CO<sub>2</sub> + 8 % de etanol.

#### 6.4 Caracterización de flavonoides obtenidos mediante extracción por líquidos presurizados

Kim y Lim (2020) realizan la extracción de flavonoides de la cáscara de mandarina con agua presurizada en un proceso semicontinuo en el que se mantiene la temperatura entre los 145- 175 °C. El caudal de agua se mantiene a una velocidad constante de entre 0,75-2,25 mL/min y la presión del proceso se sitúa en 5 MPa con un tiempo de extracción de 15 minutos. La concentración individual de flavonoides obtenidos se cuantifica mediante HPLC.

Los flavonoides obtenidos mayoritariamente son la hesperidina, narirutina, sinensetina, nobiletina y tangeretina siendo la temperatura óptima para su extracción 164,4 °C, 154,6 °C, 145,3 °C, 165,6

°C y 160,5 °C respectivamente con una velocidad de flujo de agua de 2,25 mL/min (Figura 16). Las condiciones ideales de presión y temperatura para la extracción simultánea de los cinco flavonoides corresponden a una temperatura de 158,5 °C y una velocidad de flujo de 2,25 mL/min.



**Figura 16.** Método superficie respuesta para determinar el efecto de la temperatura y la velocidad de flujo en el proceso de extracción. (a) hesperidina, (b) narirutina, (c) sinensetina, (d) nobiletina y (e) tangeretina (Kim y Lim, 2020).

En la Figura 16 se observa de forma generalizada un aumento en los rangos de extracción de los flavonoides cuando la velocidad de flujo de agua en condiciones subcríticas aumenta desde 0,75 mL/min hasta 2,25 mL/min. Esto es posible debido a que aumenta el gradiente de concentración, la velocidad superficial y la transferencia de masa entre el solvente y las muestras durante la extracción con agua subcrítica. El rango de extracción de la narirutina se ve afectado significativamente por la velocidad de flujo debido a su solubilidad en agua en comparación con el resto de los flavonoides. La extracción de la hesperidina se encuentra modificada tanto por la temperatura como por la velocidad de flujo debido a su menor solubilidad en agua en comparación con la narirutina. Los demás flavonoides se ven afectados también por la velocidad de flujo debido a su menor solubilidad en agua.

En el estudio de Plaza y Mariana (2019) para la extracción de diterpenos glicosidos a partir de *Stevia rebaudiana*, se comprobó que el mayor contenido de esteviósidos y rebaudiósidos se alcanza con una temperatura de extracción de 160 °C durante 10 minutos mediante una extracción en tres ciclos.

Para el estudio de Ko y col. (2011) se obtuvo una cantidad de quercetina de  $17,63 \pm 0,87$  mg/g de piel de cebolla correspondiendo con un 92,40 % del total de quercetina extraída en el primer ciclo de extracción. Aproximadamente el 7,60 % del total de la quercetina presente en la cebolla se



extrajeron en los siguientes ciclos. El primer ciclo de extracción presenta un gran rendimiento ya que se extrae la mayor parte de la quercetina llegándose a obtener casi la totalidad de la quercetina en la totalidad de los ciclos.

En el estudio de Lopresto y col. (2014), se realizan extracciones a 100 °C, 150 °C y 200 °C durante 30, 105 y 180 minutos y para una relación matriz-solvente de 1:4, 1:10 y 1:15 p/p. Se probó que las condiciones con las que se alcanzan un mayor rendimiento de extracción de D-limoneno usando hexano como solvente a alta presión y temperatura, se trata de una relación matriz-solvente de 1:15 a 150 °C y en un tiempo de 30 minutos consiguiendo un rendimiento del 3,56 %.

### 6.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos por los estudios descritos previamente en el apartado de materiales y métodos relativos a la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

Los resultados obtenidos por Montero (2009) muestran la actividad antimicrobiana que presentan los aceites esenciales de *Citrus volkameriana* y *Citrus latifolia* sobre diferentes bacterias Gram + y Gram -. En las tablas 5 y 6 mostradas a continuación se presentan los halos de inhibición medidos en mm provocados por el aceite esencial al 100 % obtenidos a partir de 30, 60 y 90 días de desarrollo tanto de *Citrus volkameriana* como de *Citrus latifolia*.

**Tabla 5.** Actividad antimicrobiana de *Citrus volkameriana* (CV) y *Citrus latifolia* (CL) sobre bacteria Gram + (Montero, 2009).

Bacterias Gram +	CL-30	CL-60	CL-90	CV-30	CV-60	CV-90	CONTROL (Et-OH)
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	8,7	8,5	8,2	0	0	8,3	0
<i>S. aureus</i>	0	0	8,4	8,3	8,6	8,1	0
<i>S. epidemridis</i>	0	8,2	8,0	8,5	8,5	8,5	0

**Tabla 6.** Actividad antimicrobiana de *Citrus volkameriana* (CV) y *Citrus latifolia* (CL) sobre bacterias Gram - (Montero, 2009).

Bacterias Gram -	CL-30	CL-60	CL-90	CV-30	CV-60	CV-90	CONTROL (Et.OH)
<i>C. freundii</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0

<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	8,2	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	Inter	Inter	0	0	0	0
<i>P. aureginosa</i>	0	13,4	0	0	0	14,4	0
<i>P. vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	0

En las Tablas 5 y 6 se puede observar la tendencia general de la formación de halos de inhibición con valores en torno a 8 mm para bacteria Gram + y Gram -. Para la bacteria *Pseudomonas aureginosa* no se sigue esta tendencia puesto que la actividad de los aceites esenciales es mayor. Se observa una total actividad antimicrobiana a partir de *Citrus latifolia* contra *Listeria monocytogenes* en todas sus fases de precosecha, presentando sólo *Citrus volkameriana* actividad a los 60 días de precosecha. Un motivo por el cual se puede justificar la diferencia de actividad entre ambas especies reside en la concentración de los componentes mayoritarios que presenta siendo éstos el D-limoneno y el 3- caneno.

*S. epidermis* y *S. aureus* son susceptibles al aceite esencia de *C. volkameriana* en todas sus etapas de desarrollo. El desarrollo de 60 y 90 días de *C. latifolia* presenta actividad positiva frente a *S. epidermis*, al igual que el desarrollo de 90 días lo presenta sobre *S. aureus*.

La dilución del 10 % del aceite esencial de *C. latifolia* a los 60 días de desarrollo y de *C. volkameriana* a los 90 días de desarrollo presenta actividad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* de 12,3 y 10,5 mm respectivamente. En la Tabla 6 se puede observar que ocurre lo mismo cuando el aceite esencial es del 100 % aunque los valores son más altos. Las diluciones de las muestras restantes correspondientes con 10, 1 y 0,1% no presentan actividad antimicrobiana.

Se puede observar comparando la Tabla 5 y 6 un mayor efecto inhibitorio del aceite esencial sobre las bacterias Gram +. La permeabilidad de las bacterias Gram + es mayor que la de las Gram - por lo que la difusividad del aceite esencial al interior bacteriano es mayor. Probablemente, la actividad de los aceites esenciales resida en penetrar y romper la estructura lipídica de la pared bacteriana provocando la desnaturalización de las proteínas y la destrucción de membranas celulares conduciendo a la lisis y su consecuente muerte celular.

Los resultados obtenidos por Pérez y col. (2018) sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial del limón fresco y seco a diferentes concentraciones se puede observar en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Porcentaje promedio de inhibición del aceite esencial de limón criollo sobre *B. gladioli* y *B. glumae* (Pérez y col., 2018).

		1 ppm	1000 ppm	2000 ppm	3000 ppm	4000 ppm
% para <i>B. gladioli</i>	Limón fresco	1,093	20,929	98,142	97,459	97,350
	Limón seco	96,940	97,432	97,350	97,377	97,568
% para <i>B. glumae</i>	Limón fresco	97,978	97,760	97,842	98,661	100
	Limón seco	7,404	61,038	76,202	77,768	80,163

Los datos que se muestran en la Tabla 7 se han obtenido a partir de los obtenidos por la ecuación 2 correspondiente al porcentaje del índice bactericida donde se puede observar que, para una concentración de 4000 ppm de aceite esencial de cáscara de limón fresco, se inhibe el 100 % de la bacteria *B. glumae*, alcanzándose una inhibición mayor del 90 % para las demás concentraciones estableciéndose que el aceite esencial de cáscara de limón fresco es el más eficiente contra *B. glumae*. Para el caso del limón seco sobre *B. glumae* se establece una inhibición baja debido a que el porcentaje de inhibición no supera el 90 %.

El aceite esencial de limón fresco a concentraciones de 1 y 1000 ppm presentan un bajo porcentaje de inhibición sobre *B. gladioli*, siendo más efectivo el poder antimicrobiano a concentraciones de 2000, 3000 y 4000 ppm superando el 90 % del porcentaje de inhibición. En el caso del aceite esencial de limón seco sobre *B. gladioli*, se observa gran eficacia de inhibición a todas las concentraciones por lo que se convierte en el más indicado frente a dicha bacteria.

Cabe destacar que el metabolito mayoritariamente encontrado en los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en los aceites esenciales de limón se trata del D-limoneno a una concentración del 44,78 % para limón fresco y 33,33 % para limón seco.

El D-limoneno es el metabolito mayoritario que se encuentra presente en los dos estudios que se han descrito por lo que su concentración es muy importante en cuanto al poder bactericida del propio aceite esencial.

Por último, el estudio de Argote-vega y col. (2017) establece como resultados gran susceptibilidad por parte de *Escherichia coli* frente a los tres aceites esenciales evaluados, eucalipto, mandarina y limón mientras que *Staphylococcus aureus* presenta mayor susceptibilidad al aceite esencial de eucalipto y mandarina.

## 6.6 Estudio de impregnación con CO<sub>2</sub> supercrítico

Se mostrarán a continuación, con más detalles, los resultados obtenidos para los dos estudios descritos anteriormente.

En la Tabla 8 se pueden observar los resultados obtenidos por Goñi y col. (2016) donde se realiza la impregnación con eugenol de LLDPE en las diferentes condiciones propuestas.

**Tabla 8.** Rendimientos de la impregnación supercrítica con CO<sub>2</sub> de los films de LLDPE a 45°C durante 4 horas (Goñi y col., 2016).

Presión (MPa)	Densidad CO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	Velocidad despresurización (MPa/min)	Rendimiento de la impregnación (%)
10	502,6	0,5	4,51 ± 0,29
		1	4,41 ± 0,69
		5	3,08 ± 0,77
12	659,7	0,5	4,29 ± 0,62
		1	3,54 ± 0,80
		5	3,60 ± 0,71
15	742,2	0,5	5,67 ± 0,09
		1	4,34 ± 0,20
		5	1,31 ± 1,01

Se observa que el mayor rendimiento en la impregnación se obtiene con una presión de 15 MPa y a una velocidad de despresurización de 0,5 MPa/min. Para estas condiciones, el rendimiento es del 5,67 % mientras que el rendimiento más bajo, del 1,31 % se obtiene a una presión de 15 MPa y a una velocidad de despresurización de 5 MPa/min por lo que se evidencia la influencia que presenta la velocidad de despresurización sobre la impregnación del eugenol en LLDPE.

Las presiones de 10 MPa y 12 MPa presentan dependencia de la velocidad de despresurización para el rendimiento. A 10-12 MPa, la carga impregnada de eugenol parece depender débilmente de la velocidad de despresurización del proceso. Esto puede explicarse por el hecho de que en esas condiciones el eugenol está cerca de su límite de solubilidad y por lo tanto una pequeña disminución de la presión puede ser suficiente para producir su precipitación parcial, reduciendo su concentración en la fase fluida al valor de saturación.

Los datos obtenidos en este estudio se encuentran en concordancia con los obtenidos por Yokozaki y col. (2015) en el que se realiza la impregnación de ácido salicílico en lentes de

contacto con CO<sub>2</sub> supercrítico donde para una temperatura y presión constante, existe un mayor rendimiento en el proceso de carga a velocidades bajas de despresurización. Ocurre lo mismo para el estudio de Champeau y col. (2015) en el que se ha observado que para una menor velocidad de despresurización existe un mayor rendimiento en la impregnación de ketoprofeno en fibras de ácido poliláctico (PLA) además de una distribución homogénea.

Los diferentes rendimientos se pueden explicar por la combinación de la presión de impregnación y la velocidad de despresurización. Cuando la presión es de 15 MPa, el grado de plasticidad del polímero y el hinchamiento que sufre es mayor, así como la cantidad de eugenol que se puede cargar. Si se produce la despresurización a una velocidad alta, el eugenol se escapa con el CO<sub>2</sub> y se condensa fuera del film. Una baja velocidad de despresurización permite recuperar su estructura y el grado de cristalinidad permitiendo que quede atrapada una mayor cantidad de eugenol. De esta forma podemos explicar que el mayor rendimiento se haya obtenido a 15 MPa y a una velocidad de despresurización de 0,5 MPa/min.

Los resultados obtenidos en el estudio de Milovanovic y col. (2015) se pueden observar en la Tabla 9 donde se representa el rendimiento de la impregnación del timol en acetato de celulosa a diferentes tiempos y presión.

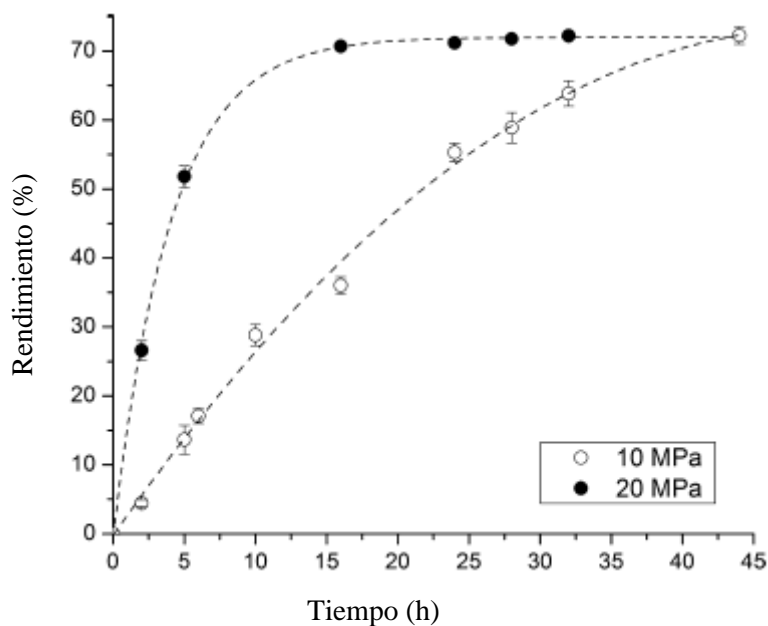
**Tabla 9.** Rendimiento de la impregnación supercrítica a 35 °C (Milovanovic y col., 2015).

<b>Tiempo (h)</b>	<b>10 MPa</b>	<b>20 MPa</b>
	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>2</b>	4,4 ± 0,49	26,60 ± 1,39
<b>5</b>	13,65 ± 2,10	51,80 ± 1,56
<b>6</b>	17,09 ± 1,08	-
<b>10</b>	28,83 ± 1,54	-
<b>16</b>	36,02 ± 1,24	70,70 ± 0,50
<b>24</b>	55,31 ± 1,37	71,21 ± 0,41
<b>28</b>	58,90 ± 2,20	71,78 ± 0,13
<b>32</b>	63,84 ± 1,84	72,20 ± 0,26
<b>44</b>	72,26 ± 1,26	72,26 ± 0,28

Según se muestra en la Tabla 9, la capacidad de carga del acetato de celulosa no depende de la presión. Se obtiene un rendimiento de 72,26 % para ambos casos. La impregnación ocurre más rápida cuando se realiza a 20 MPa lo que puede deberse al incremento de difusividad en la matriz sólida y al aumento de la solubilidad del timol en CO<sub>2</sub> supercrítico lo que hace que la fuerza

impulsora sea mayor. No se han obtenido datos para los tiempos de 6 y 10 horas cuando se realiza la impregnación a 20 MPa lo que puede deberse a fallos en el procedimiento experimental.

En la Figura 17 se puede observar de forma clara la dependencia de este proceso al tiempo, ya que a 20 MPa se obtiene un rendimiento en torno al 70 % en 16 horas mientras que cuando se realiza la impregnación a 10 MPa, se alcanza transcurridas 44 horas.



**Figura 17.** Rendimiento de la impregnación de timol en acetato de celulosa a 35 °C  
(Milovanovic y col., 2015).

Cuando el rendimiento de impregnación es menor del 9 %, no existe cambios en la estructura del polímero. Entre un 9 % y 13 % de rendimiento, el polímero comienza a hincharse comenzando a aglutinarse cuando el rendimiento se encuentra entre el 55 % y el 57 %. El polímero pierde completamente su forma cuando el rendimiento es mayor del 60 %.

## 7. CONCLUSIONES

De la discusión precedente de los resultados experimentales y del análisis bibliográfico realizado, es posible realizar las siguientes conclusiones:

1. El estudio de la extracción de los compuestos bioactivos a partir de la piel de limón indica que los mejores resultados se obtienen a partir de la extracción con solventes orgánicos. Se establece que, para el limón real, las mejores condiciones de extracción se alcanzan a partir de la cáscara húmeda y a una temperatura de 76 °C durante 4 horas utilizando el metanol como solvente orgánico.
2. El análisis de los resultados experimentales de la extracción con fluidos supercríticos indica que los mejores resultados se obtienen a la presión, temperatura y porcentaje de codisolvente más elevado, obteniéndose el mayor rendimiento a la presión de 400 bar, temperatura de 55 °C y usando la mezcla CO<sub>2</sub> + etanol como disolvente.
3. Para la extracción a partir del limón sin semilla y limón criollo, se obtienen los mejores resultados de extracción a 76 °C durante 4 horas utilizando como materia prima la cáscara húmeda en ambos casos y con acetona como solvente orgánico.
4. De los diferentes aceites esenciales evaluados, el obtenido a partir del limón criollo es el que ofrece mejores resultados antimicrobianos. El aceite esencial obtenido a partir del limón seco es el que presenta un mayor porcentaje de inhibición superando para todas las concentraciones el 96 % frente a *B. gladioli*. Para *B. glumae*, el aceite esencial que presenta mayor porcentaje de inhibición es el obtenido a partir de limón fresco, superando para todas las concentraciones el 97 % de inhibición alcanzando incluso el 100 % cuando la concentración es de 4000 ppm.
5. En cuanto a las técnicas de impregnación, el estudio realizado para impregnar eugenol en LLDPE arroja como mejor resultado su realización una presión de 15 MPa con una velocidad de despresurización de 0,5 MPa/min alcanzándose un rendimiento del 5,67 %.
6. Para la impregnación de timol en acetato de celulosa, se consigue un rendimiento en torno al 70 % cuando se realiza a 20 MPa durante 16 horas. Sin embargo, para alcanzar un rendimiento similar en la impregnación a 10 MPa es necesario un tiempo de 44 horas por lo que resulta menos eficiente respecto al tiempo.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

El uso de envases activos ofrecerá grandes ventajas en cuanto a la conservación de alimentos perecederos tales como frutas y verduras. Por otra parte, está contribuyendo a la síntesis de una mayor cantidad de plástico procedente de fuentes no renovables como el petróleo, lo que supondrá a largo plazo un incremento del problema medioambiental al que nos enfrentamos día a día.

Debido al gran impacto en los últimos años del uso de envases activos, es necesario un nuevo enfoque en cuanto a los polímeros utilizados para su fabricación. Los polímeros de origen biológico constituyen una alternativa respetuosa con el medio ambiente.

En el presente trabajo se propone evaluar la posibilidad de impregnar con aceite esencial de limón polímeros biodegradables utilizando la impregnación supercrítica, ya que supone una técnica de impregnación afín con el medio ambiente.

Aunque los polímeros biodegradables presentan un tiempo de vida corto respecto a los convencionales, la producción de desechos no cesa, por lo que una posible solución que se plantea para investigaciones futuras es la evaluación de la impregnación de polímeros de fibras vegetales comestibles con los componentes bioactivos del limón.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Argote-vega, F. E., Suarez-montenegro, Z. J., Tobar-delgado, M. E., Perez-alvarez, J. A., Hurtado-benavides, A. M., & Delgado-ospina, J. (2017). *Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli* *Evaluation of the inability capacity of essential oils in Staphylococcus aureus and Escherichia coli* *Capacidade de avaliação inibitório de óleos essen.* 2, 52–60.
- Micó-Vicent, B. Francisco M. Martínez Verdú, Roberto Moltó Pérez, Eduardo J. Gilabert Pérez, Eduardo Fagés Santana, Elvira Casas Sanz. *“Impregnación en CO<sub>2</sub> supercrítico de diferentes sustratos poliméricos, como alternativa a los tratamientos textiles, comúnmente empleados en el Mediterráneo”* (Mediterranea. Serie de Estudios Biológicos. Época II. ISSN 1130-6203, pág. 78, n.22, 2011.
- Benjamin, O., Moses, A., Ogidi, C. O., & Akinyele, B. J. (2019). Bioactivity of Citrus essential oils ( CEOs ) against microorganisms associated with spoilage of some fruits. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0160-5>.
- Betanzos Salguero, C. (2019). *Impregnación supercrítica de compuestos activos en polímeros utilizados en el envasado de alimentos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Cádiz.
- Casado, I. (2018). *Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Madrid.
- Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Gordillo, M.D., Torres, A., Macías, F.A., Martínez de la Ossa, E. *Effect of the pre-treatment of the samples on the natural substances extraction from Helianthus annuus L. using supercritical carbon dioxide*. *Talanta* 67 (2005) 175–181.
- Champeau M, Thomassin JM, Tassaing T, Jérôme C. *Drug loading of polymer implants by supercritical CO<sub>2</sub> assisted impregnation: A review*. *J Control Release*. 2015;209:248-259. doi:10.1016/j.jconrel.2015.05.002
- Cejudo, C. (2019). *Impregnación supercrítica de extractos naturales en la preservación de alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Cendales Ladino, E.D. (2011). *Producción de biogás mediante la codigestión anaeróbica de la mezcla de residuos cítricos y estiércol bovino para su utilización como fuente de energía renovable*. Trabajo Fin de Máster. Universidad Nacional de Colombia.
- Cerpa, M. G., Mato, R. B., & Cocero, M. J. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales. Modelado y caracterización. *AIChE Journal*.
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). *ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN* Mariano Cerutti y Fernando Neumayer \*. Revista de investigación académica. INVENIO.149–155.
- Conesa, E., & Técnico, R. (2018). *Poscosecha de los cítricos*. Curso Tecnología Poscosecha de cítricos y otros cultivos en la Comunidad Valenciana. Universitat Politècnica de València. 1–41.
- Curi, C., Rocio, Y., Cantorin, Y., & Ana, F. (2018). *Influencia de la presión y temperatura en la extracción de aceite esencial inka muña ( Satureja inkana ) por CO<sub>2</sub> supercrítico*.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 52–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug*

- Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Espinosa Carranza, N.N., Rocha Estrada, A. (2019). *Los aceites esenciales y su importancia*. Año 15, No. 26 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Diciembre 2019. Pág. 7-10.
- Esquivel F., A., & Vargas Aguilar, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología En Marcha*, 20(4), 7.
- FAO, 2016. Recuperado el 10 de mayo de 2020, a partir de <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>
- Franco, P., Incarnato, L., & De Marco, I. (2019). Supercritical CO<sub>2</sub> impregnation of  $\alpha$ -tocopherol into PET/PP films for active packaging applications. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 34(June), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.06.012>
- Frutas & Hortalizas.(2020). Recuperado el 7 de abril de 2020, a partir de <https://www.frutas-hortalizas.com/Frutas/Presentacion-Limon.html>
- García-Casas, I., Crampon, C., Montes, A., Pereyra, C., Martínez de la Ossa, E. J., & Badens, E. (2019). Supercritical CO<sub>2</sub> impregnation of silica microparticles with quercetin. *Journal of Supercritical Fluids*, 143(August 2018), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.019>
- Gil Zanón, F. (2016). *Mejora de una instalación de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico: Diseño del software de control e incorporación de una bomba diafragma*. Trabajo Fin de Grado. Universitat Politècnica de València.
- Gómez Cepero, E. (2019). *Apósitos mediante la impregnación supercrítica de extractos bioactivos de hojas de mango*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Cádiz.
- Goñi, M. L., Gañán, N. A., Herrera, J. M., Strumia, M. C., Andreatta, A. E., & Martini, R. E. (2017). Supercritical CO<sub>2</sub> of LDPE films with terpene ketones as biopesticides against corn weevil (*Sitophilus zeamais*). *Journal of Supercritical Fluids*, 122, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.017>
- Goñi, M. L., Gañán, N. A., Strumia, M. C., & Martini, R. E. (2016). Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. *Journal of Supercritical Fluids*, 111, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.01.012>
- Goyena, R., & Fallis, A. . (2019). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Henning, C. P., Blanco, M., Arango, M. C., Yordaz, R. M., & Viña, S. Z. (2016). Producción de especies aromáticas: obtención y usos de los aceites esenciales relacionados a su bioactividad. *Contacto Rural*; No.3, 4–6.
- Hernández-Cázares, A., Real-Luna, N., Delgado-Blancas, I., & Bautista-Hernández, J] Velasco-Velasco, J. (2016). Residuos Agroindustriales Con Potencial De Compostaje. *Agroproductividad*, 9(8), 10–17.
- Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible (2018). Recuperado el 12 de mayo de 2020, a partir de <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/actualidad/noticias/detalle/190981.html>
- Khuwijtjaru, P., Chaloodong, K., & Adachi, S. (2008). Phenolic content and radical scavenging capacity of kaffir lime fruit peel extracts obtained by pressurized hot water extraction. *Food Science and Technology Research*, 14(1), 1–4. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.1>
- Khvalbota, L., Roy, D., Wahab, M. F., Firooz, S. K., Machyňáková, A., Špánik, I., & Armstrong, D. W. (2020). Enhancing supercritical fluid chromatographic efficiency: Predicting effects of small aqueous additives. *Analytica Chimica Acta*, 1120, 75–84.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.065>

- Kim, D. S., & Lim, S. Bin. (2020). Semi-continuous subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel: Their antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Antioxidants*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050360>
- Klimek-szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). Citrus limon (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010119>
- Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., & Chung, M. S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*, 102(4), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.008>
- Koshima, C. C., Capellini, M. C., Geremias, I. M., Aracava, K. K., Gonçalves, C. B., & Rodrigues, C. E. C. (2012). Fractionation of lemon essential oil by solvent extraction: Phase equilibrium for model systems at T = 298.2 K. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 54, 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2012.05.011>
- Leytón, O., Saavedra, J., Segura, K., Solorzano, L., & Pretell, O. (2016). Efecto del aceite esencial de los frutos y semillas de Pimpinella anisum sobre el crecimiento de Staphylococcus aureus. Effect of essential oil of fruits and seeds of Pimpinella anisum on the growth of Staphylococcus aureus. *REBIOL Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú*, 36(1), 65–68.
- Lopresto, C. G., Petrillo, F., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., & Calabrò, V. (2014). A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. *Separation and Purification Technology*, 137, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.015>
- Luna, D. (2014). *Facultad de Ciencias Exactas , Físicas y Naturales Facultad de Ciencias Exactas , Físicas y Naturales*. [file:///C:/Users/orlin\\_vasquez/Desktop/Tesis final.impresion.pdf](file:///C:/Users/orlin_vasquez/Desktop/Tesis%20final/impresion.pdf)
- Medeiros, G. R., Guimarães, C., Ferreira, S. R. S., & Carciofi, B. A. M. (2018). Thermomechanical and transport properties of LLDPE films impregnated with clove essential oil by high-pressure CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*, 139(March), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.05.006>
- Medrano Gastrañuadi, M. de J. (2019). *EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE Citrus aurantifolia (LIMÓN PERUANO) FRENTE A Staphylococcus aureus* (p. 51).
- Milovanovic, S., Hollermann, G., Errenst, C., Pajnik, J., Frerich, S., Kroll, S., Rezwan, K., & Ivanovic, J. (2018). Supercritical CO<sub>2</sub> impregnation of PLA/PCL films with natural substances for bacterial growth control in food packaging. *Food Research International*, 107(February), 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.065>
- Milovanovic, S., Stamenic, M., Markovic, D., Ivanovic, J., & Zizovic, I. (2015). Supercritical impregnation of cellulose acetate with thymol. *Journal of Supercritical Fluids*, 97, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.11.011>
- Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente (2012). Producción y consumo sostenible y recursos agrarios- Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Recuperado el 22 de marzo de 2020, a partir de [https://www.miteco.gob.es/images/es/Residuos%20agrarios\\_tcm30-193059.pdf](https://www.miteco.gob.es/images/es/Residuos%20agrarios_tcm30-193059.pdf)
- Montero Celis, Y. (2009). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del limón persa (Citrus latifolia Tanaka)*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Veracruzana.

- Montes, A., Pereyra, C., Martínez, E. J., Ossa, D., Montes, A., Pereyra, C., & Ossa, E. M. De. (2018). *USANDO TECNOLOGÍA SUPECRÍTICA*. July, 2014–2015. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18681.77927>
- Morère Rodríguez, J. (2017). *DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I Síntesis de nanoestructuras de Ru, Ni y Pt sobre SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS DE Ru, Ni y Pt sobre soportes porosos utilizando CO2 supercrítico*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Mosquera, J. E., Goñi, M. L., Martini, R. E., & Gañán, N. A. (2019). Supercritical carbon dioxide assisted impregnation of eugenol into polyamide fibers for application as a dental floss. *Journal of CO2 Utilization*, 32(April), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.04.016>
- Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., & Garcia, C. (2010). Extracción y caracterización del aceite esencial de manarina obtenido de residuos agroindustriales. *DYNA (Colombia)*, 77(162), 85–92.
- Oliver, Andreu Palou. Badiola Díez, Juan José. Navarro, Arturo Anadón, Cacho Palomar, Juan Francisco. Camean, A. M., Fernández, Alberto Cepeda. Rodríguez, L. R., & Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Bermudo, F. M. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes. *Revista Del Comité Científico*, n3, 98–105. [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion\\_riesgos/comite\\_cientifico/ENVA SES\\_ACTIVOS\\_INTELIGENTES.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/ENVA SES_ACTIVOS_INTELIGENTES.pdf)
- Peñaranda, L. V., Montenegro, S. P., & Giraldo, P. A. (2018). Exploitation of agroindustrial waste in Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 141–150. <https://doi.org/10.22490/21456453.2040>
- Pérez, A., Villarreal, J., Pérez, Y., Ramírez, A., & Rangel, M. (2018). ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis*) Y LIMÓN CRIOLLO (*Citrus aurantifolia*) COMO CONTROL EN EL AÑUBLO BACTERIAL DE LA PANÍCULA DEL ARROZ. @limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 15(2), 28. <https://doi.org/10.24054/16927125.v2.n2.2017.2966>
- Plaza, M., & Marina, M. L. (2019). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 116, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.024>
- Prieto Laria, P. (2019). *Evaluación del potencial bioactivo de extractos obtenidos a partir de Limoniastrum monopetalum utilizando técnicas a alta presión*. Trabajo Fin de Grado. Universida de Cádiz.
- Quevedo, C. (2011). *Diseño de una planta piloto de extraccion de aceites esenciales de limón usando CO2 como fluidos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Piura.
- Rivas, C. F. (2012). Envases Activos E Inteligentes : Control De La Calidad Y Seguridad Del Producto. *Instituto Tecnologico de Embalaje y Logistica*, 34.
- Rivera Narváez, Carlos M.; Cardona Bermúdez, Liliana M.; Muñoz, Laura M.; Gómez, Dorely D.; Passaro Carvalho, Catarina.; Quinceno Rico, J. M. (2016). *Guía De Extracción Por Fluidos Supercríticos: Fundamentos Y Aplicaciones*. 48.
- Romero, C., Belisario, C., M. Blasco. (2004). Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Ciencia : refereed scientific journal from the Experimental Faculty of Sciences at La Universidad del Zulia. *Ciencia*, 12(4), 309–314. <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/ciencia/article/view/9231/9220>
- Salazar de la Rosa, N. I. (2018). Manejo de residuos sólidos en las empresas alimentarias. *Universidad Nacional Agraria La Molina*, 68. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3586>

- Saleem, M., & Saeed, M. T. (2020). Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013>
- Sanchez Camargo, A. del P. (2017). *Desarrollo de nuevas estrategias de extracción para la obtención de compuestos bioactivos*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sandoval Leyva, M.D., Romero Guido, B.A. (2017). *Extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de frutos cítricos de Nicaragua para la formulación de resina fenólica*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Nacional de Ingeniería.
- Sepahpour, S., Selamat, J., Manap, M. Y. A., Khatib, A., & Razis, A. F. A. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules*, 23(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23020402>
- Simarro Rueda, M. E. (2019). *Efecto antibacteriano de nanopartículas de sílice y polietilenimida sobre cepas bacterianas causantes de peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal*. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla- La Mancha.
- Sharma, K., Mahato, N., & Lee, Y. R. (2019). Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35(2), 265–284. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0027>
- Stashenko, E. E. (2009). Aceites Esenciales. *División de Publicaciones UIS*, 180.
- Stashenko, E. E., Gutiérrez-Avella, D. M., Martínez, J. R., & Manrique-López, D. L. (2017). Análisis por GC/FID y GC/MS de la composición química y estudio de la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por diferentes técnicas, de *Satureja viminea* L. cultivada en Colombia. *Scientia Chromatographica*, 9(1), 25–39. <https://doi.org/10.4322/sc.2017.003>
- Vargas y Vargas, M. de L., Figueroa Brito, H., Tamayo Cortez, J. A., Toledo López, V. M., & Moo Huchin, V. M. (2019). Aprovechamiento de cáscaras de frutas: análisis nutricional y compuestos bioactivos. *CIENCIA Ergo Sum*, 26(2), 1–11. <https://doi.org/10.30878/ces.v26n2a6>
- Vignola, M. B., Serra, M. A., & Andreatta, A. E. (2020). Actividad Antimicrobiana de Diversos Aceites Esenciales en Bacterias Benéficas, Patógenas y Alterantes de Alimentos. *Revista Tecnología y Ciencia*, 92(37), 92–100. <https://doi.org/10.33414/rtyc.37.92-100.2020>
- Weidner, E. (2018). Impregnation via supercritical CO<sub>2</sub>—What we know and what we need to know. *Journal of Supercritical Fluids*, 134(October 2017), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.024>
- Yokozaki, Y., Sakabe, J., Ng, B., & Shimoyama, Y. (2015). Effect of temperature, pressure and depressurization rate on release profile of salicylic acid from contact lenses prepared by supercritical carbon dioxide impregnation. *Chemical Engineering Research and Design*, 100, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.05.008>